

# **Paralóg jelátviteli útvonalak finom szabályozásának szerkezeti alapú vizsgálata**

Doktori értekezés

**Glatz Gábor**

*okleveles biológus*

***ELTE Biológia Doktori Iskola, Szerkezeti Biokémia Program***

*Iskolavezető: Dr. Erdei Anna*

*Programvezető: Dr. Nyitray László*

*Témavezető: Dr. Reményi Attila*



2015.

## **Tartalomjegyzék**

<b>1.Bevezetés</b>	<b>3.</b>
<b>2.Irodalmi áttekintés</b>	<b>6.</b>
2.1 Foszforiláció és kinázok	6.
2.2 Kinázok csoportosítása	8.
2.3 A Mitogén Aktivált Protein Kinázok általános jellemzői	11.
2.4 Az ERK5 jelpálya jellemzői	16.
2.5 MAP Kinázok szerkezeti jellemzői	18.
2.6 A nem-proteolitikus ubikvitináció jellemzői	23.
<b>3.Célkitűzés</b>	<b>26.</b>
<b>4.Anyagok és módszerek</b>	<b>27.</b>
4.1 PCR	27.
4.2 Irányított mutagenézis	27.
4.3 Restrikciós endonukleáz kezelés	28.
4.4 DNS tisztítása gélből	28.
4.5 Ligálás	29.
4.6 Transzformálás és a sejtek növesztése	29.
4.7 Miniprep készítés és ellenőrzés	30.
4.8 Fehérje termelés	30.
4.9 Bakulóvírusos fehérje termelés	31.
4.10 Fehérje tisztítás affinitás kromatográfiával	32.
4.11 Ioncsere, töményítés	33.
4.12 Fluoreszcencia polarizációs mérések	33.
4.13 Pull-down kísérletek	35.
4.14 <i>In vitro</i> foszforilációs kísérletek	36.
4.15 <i>In vitro</i> ubikvitinációs kísérletek	37.
4.16 Gélfiltrálás és Kristályosítás	37.
<b>5. Eredmények</b>	<b>39.</b>
5.1 A rekombináns fehérjék előállítása	39.
5.2 MKK5-ERK5 interakció feltérképezése	40.
5.3 Az MKK5-ERK5 komplex és apoERK5 szerkezetek meghatározása	46.

5.4 Az ERK2 és ERK5 fehérjék közötti szubsztrát specificitás szerkezeti tényezői	48.
5.5 Az MKK5 PB1 domén állványozó szerepe	53.
5.6 Az ERK5 jelpálya ubikvitin-függő szabályozása	55.
6. Eredmények megvitatása	60.
7. Összefoglaló	64.
8. Abstract	66.
9. Melléklet	67.
10. Hivatkozások	70.
11. Rövidítésjegyzék	79.
12. Köszönetnyilvánítás	82.

## 1. Bevezetés

Minden élő rendszernek elengedhetetlen a megfelelő működéséhez, hogy környezetével állandó kapcsolatot tartson fenn, a változásokra reagáljon, és azokra a megfelelő fiziológiás válasz kiváltása révén alkalmazkodjon. A sejtek szintjén ez a kapcsolat a „külvilággal” egy főleg fehérjékből felépülő jelátviteli hálózat által jön létre. Ennek a hálózatnak a feladata, hogy a környezetből érkező ingert felfogja, feldolgozza és indukálja a megfelelő biológiai választ.

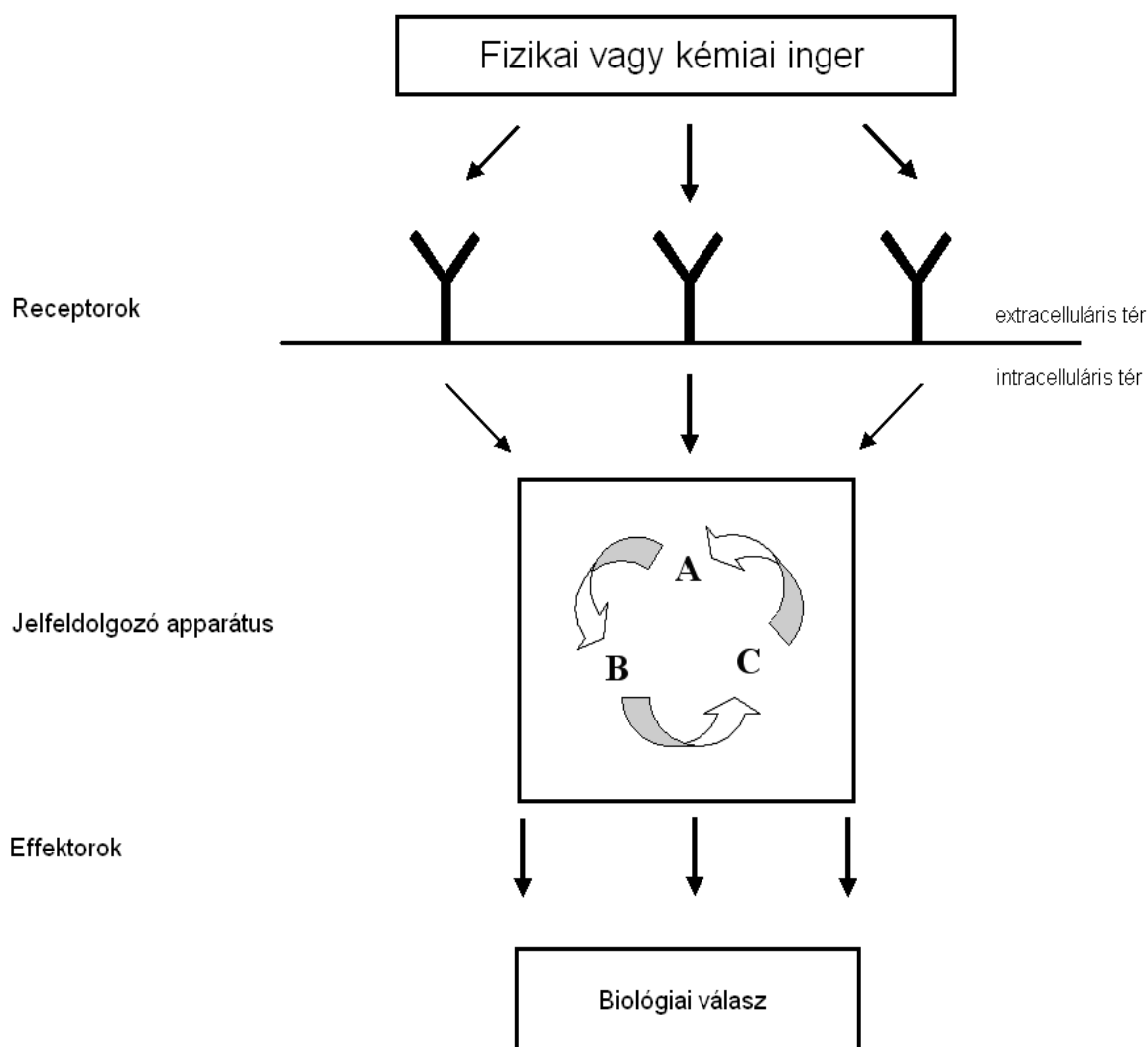
A jel átalakítása, függetlenül attól, hogy az milyen fizikai és kémiai tulajdonságokkal bírt, alapvetően három különböző mechanizmus alapján működő jelfeldolgozó apparátus feladata. Ez a három folyamat lehet a sejten belüli lokalizáció változása, fehérjék konformáció változása, vagy poszttranszlációs módosítás (**1. ábra**). A poszttranszlációs módosítás lényege, hogy a szignál transzdukcióban részt vevő fehérjén kémiai változás történik. A módosítás többféleképpen jöhet létre. Történhet a fehérje hasításával (pl.: proteázok által) vagy történhet egy kémiai csoport fehérjéhez való kovalens kötődésével, amely ezáltal aktív formába kerül. A kémiai csoport jellemzői döntően befolyásolják a fehérje átalakulását, olyan változásokat indukálnak a fehérje szerkezetében, ami annak aktivitását jelentősen befolyásolni tudja. Ezért a sejt jelátvitel elemeinek atomi szintű jellemzése nagymértékben segíti a kutatót az egyes útvonalak működésének megismerésében.

Disszertációm főszereplőit képző kinázok szerepe a sejt jelátvitelben fontos és sokrétű. Számtalan élettani folyamatot befolyásolnak, annak ellenére, hogy számuk ehhez képest csekély. Az emberben összesen 518 különböző protein kináz található. Ebből következik, hogy egy kináz több fiziológiás válasz kiváltásában vesz (vehet) részt, aktivitásuk több ponton szabályozott, hogy mindig a megfelelő folyamat menjen végbe. Ez a pontos szabályozás annak tükrében különösen érdekes, hogy fehérje kinázok katalitikus doménjeiket tekintve nagyon hasonlóak. Működésük finom szabályozásáról a mai napig igen keveset tudunk, ezért doktori munkám során szerkezeti alapon szándékoztam fehérje kinázok alkalmazásán alapuló jelátviteli útvonalak különbözőségeit feltárni.

Mai ismereteink alapján a fehérje kinázok evolúciós rokonságban állnak. Kináz doménjeik hasonló szerkezeti felépítést mutatnak és valószínűleg korábbi gén- és/vagy genom duplikációs események révén alakult ki a mai emlősök változatos kinomját felépítő diverzitás.

Milyen molekuláris mechanizmusok tették lehetővé azonos eredetű és hasonló szerkezeti tulajdonságokkal rendelkező fehérje kinázok számára, hogy fiziológiás szempontból akár ellentétes értelmű folyamatokat szabályzó jelfeldolgozó apparátusok központi enzimei legyenek. Dolgozatomban az ERK2 és ERK5, illetve az ERK5 és JNK1 mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) aktivitásán alapuló jelátviteli pályák specifikus működését biztosító molekuláris törvényszerűségeket vizsgáltam.

Összehasonlító és molekuláris szintű megközelítésem mögött az a meggyőződés áll, hogy a természetes jelfeldolgozó rendszerek tanulmányozása során megismert alapelveket a specifikus hatóanyag tervezés gyakorlati megvalósításában is felhasználhatjuk.



**1. Ábra)** A szignál transzdukció általános folyamata. A környezetből érkező ingert a receptorok felfogják, majd a sejten belül a jelfeldolgozó apparátus továbbítja az végrehajtó molekulák fele. A továbbiakban ezek közvetlenül indukálják a biológiai válasz létrejöttét. A jelfeldolgozó apparátust három alapvetően különböző természetű folyamat jellemzi, melyek egymással kapcsolatban állnak (**A** konformáció változás, **B** poszttranszlációs módosítás, **C** lokalizáció változás).

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1 Foszforiláció és kinázok

Már 1930-ban Carl és Gerty Cori felfedezték, hogy a glikogén foszforiláz rendelkezik két formával („a” és „b”). A „b” forma csak 5' AMP jelenlétében volt aktív, míg a másik forma ennek hiányában. Csak 13 évvel később fedezték fel azt az enzimet, ami az „a” formát „b”-re alakította át, a foszfát-csoport eltávolításával. Ezt az aktivitást nagyon specifikus, ritka biokémiai folyamatnak hitték tévesen(1). 1954-ben írták le először tényként a protein kinázok szerepét. Vesesejtekben figyelték meg, hogy egy enzim a kazeinre foszfát-csoportot helyez. Később Fischer és Krebs, akárcsak Wosilait és Sutherland is megtalálták az összefüggést a glikogén foszforiláz „a” és „b” formája közötti foszforilált/defoszforilált állapotok között. Ezek után a foszforilációért felelős enzimet elnevezték foszforiláz kináznak, míg a defoszforilációt végre hajtó fehérjét foszfatáznak. Későbbiekben tisztázódott, hogy amit eleinte specifikus mechanizmusnak hittek, az valójában az élő szervezetekben általánosan előforduló, szabályzó molekuláris folyamat(2).

Manapság már tudjuk, hogy a foszforiláció a fehérjék működésének széles spektrumát képes befolyásolni, például serkenti vagy gátolja azok biológiai aktivitását, stabilizálja vagy pusztulásra „ítéli”, esetleg megkönnyíti vagy hátráltatja a fehérjék sejten belüli mozgását. A mechanizmus egyszerűsége, reverzibilitása (foszfatázok révén), valamint az ATP szerepe mint könnyen elérhető foszfát-csoport donor adhat magyarázatot arra, hogy miért is vált az eukarióta sejtek legáltalánosabb szabályzó mechanizmusává a foszforiláció(3)(4).

A foszfát-csoport mozgása a folyamat alatt, ahogy azt már korábban említettem, az ATP-ből indul. A molekula  $\gamma$ -foszfát csoportja ( $P_i$ ) helyeződik át az adott fehérje egy olyan aminosav oldalláncára, amelyen nukleofil O vagy ritkán N atom található. Ezek az oldalláncok általában a szerin, treonin és a tirozin aminosavak részei, bár prokarióta, ősbaktérium és eukarióta növényi szervezetekben jellemző a hisztidin és az aszparaginsav is. A foszfát-csoport fiziológiai körülmények között két negatív töltést hordoz magán, ezért, ha kovalens módon kötődik a fehérjéhez, ekkor jelentős konformáció változást tud indukálni a fehérjében ionos- vagy hidrogén-kötések révén. Így olyan részek válnak elérhetővé, gátlás

esetén elérhetetlenné, amelyek az enzim működésében elengedhetetlenek (pl.: aktív centrum). A foszforiláció az esetek egy részében egy fehérjén nem csak egy oldalláncon történik meg. Így az egyes aminosav oldalláncok foszforiláltsága egymáshoz képest viszonyított állapota is szabályozó hatással van. Például egy fehérjénél, amelynek két darab oldalláncára kerülhet foszfát-csoport, az aktív állapot eléréséhez mindkettőnek foszforilálva kell lenni, de lehetséges hogy csak elegendő az egyiknek(5). De az a szabályzó kapcsolat is fennállhat, hogy az egyik oldallánc foszforiláltsága gátolja a másik oldallánc foszforiláltságát. Ezzel a fehérjén belüli igen finom szabályozhatóság valósulhat meg(6).

Az egyes molekulákra helyezett foszfát-csoport nem csak szerkezetmódosítási képességgel befolyásolhatja a jelátviteli útvonalakat, hanem mint „kiolvasható” jel is megváltoztathatja egyes fehérjék működését. A jel kiolvasásához bizonyos szerkezeti egységek, domének szükségeltetnek. Ilyen domén például a SH2 és WW nevű domének, melyek közül az előbbi tirozin, míg a második szerin/treonin oldalláncára felhelyezett foszfát-csoportokat érzékelnek, és ezáltal befolyásolják az őket tartalmazó fehérjék aktivitását vagy lokalizációját(7)(8)(9)(10). A 14-3-3 nevű fehérje család tagjai is hasonló regulátor funkciókat látnak el. Például a dimer 14-3-3ζ fehérje a RAF1 kináz egy-egy foszforilált szerin aminosavához kötve tartja a kinázt inaktív állapotban(11).

A foszforiláció, mint a poszt-transzlációs módosulások evolúciósan legelterjedtebb formája, már a törzsfajlás során igen hamar kialakult. Már a prokariótáknál és az ősbaktériumoknál is felfedeztek olyan molekuláris mechanizmust, aminek alapja foszfát-csoportok transzfere. Ehhez a folyamathoz párhuzamosan a kinázok, mint foszfortranszferáz fehérjék megjelenése is igen korai időre tehető(12)(13)(14)(15).

A fehérje kinázok tehát olyan enzim fehérjék, amelyek a foszfát-csoport áthelyezésén alapuló jelátviteli folyamatban vesznek részt. Feladatuk, hogy foszforilálják a célmolekulát, és ezzel biztosítsák a jel útját a kezdeti ponttól a végpontig. Egyfajta kapcsoló molekulákként, be- és kikapcsolt állapotuk függvényében képesek befolyásolni az igen komplex szignál transzdukciós hálózat útvonalait. Élettani szerepükhöz képest, az egyes szervezetekben előforduló kinázok száma csekély. Mégis, változatos szabályozhatóságuk és a jelátviteli hálózatok integritásának köszönhetően, a szervezet igen specifikusan képes reagálni a környezet változásaira.



A kinázok csoportba sorolásának egyik alapja, amely nem genomiális analízisekből alkotott rokonsági viszonyokat feltüntető rendszer, hogy maga az enzim, a szubsztrát milyen aminosav oldalláncra helyezi a foszfát-csoportot. E szerint az osztályozás szerint vannak hisztidin, aszpartát (ezek csak prokariótákban, Archeákban és eukarióta növényekben fordulnak elő), tirozin és szerin/treonin oldalláncokat foszforiláló kinázok. Az eukarióta állatokban csak az utóbbi két típus van jelen, és ezek szerkezeti homológiája mutatja, hogy evolúciósan rokoni viszonyban állnak(16)(17). A kinázok szerepe az egyes fiziológiai folyamatokban igen sokrétű. Az egysejtű organizmusok osztódásai, a többsejtű szervezetek immunfolyamatai, vagy komplex idegi hálózat kialakítása mind köthetőek különböző kinázok működéséhez. A sejtosztódás, a sejtciklus szabályozása, a sejt lokalizációja vagy differenciációja is mind olyan élettani folyamat, amelyben kinázok fontos szerepet töltenek be. Az egyes élettani folyamatokban részt vevő kináz családok és azon belül található kinázok száma jól mutatja az egyes szervezetek fejlettségi szintjét. A neurális fejlődésben szerepet vállaló kinázok száma az egyes modell szervezetekben, például *Drosophila*, *C. elegans* és az ember esetén jól mutatja a szervezetek neurális fejlettségi fokát. Például Eph kináz családban a légy és a féreg esetén is csak egy-egy fehérjét találunk, míg az embernél ebbe a csoportba már 14 kináz tartozik. Ugyanilyen korreláció figyelhető meg az immun-, apoptikus és sejtosztódási folyamatokat szabályzó kinázok esetén is(18).

A gerincesek kialakulásának korai szakaszán megfigyelhető kináz gén szám növekedés jól magyarázható a korai gerincesek kialakulásakor bekövetkező kis- és nagymértékű gén, valamint genomduplikációk következményeként(19)(20)(21)(22).

## 2.2 Kinázok csoportosítása

Az 1970-es években, a DNS klónozás és szekvenálás megjelenésével bebizonyosodott hogy az eukarióta protein kinázok igen nagy családot alkotnak. Az első jóslások szerint az emberi genom körülbelül 1000 kinázt kódolhat(23). Ám ma már tudjuk, hogy ez a szám fele csak a megjósoltak, mivel 518 protein kinázt kódoló gént azonosítottak. Ez ennek ellenére is nagy szám, mert a teljes emberi genom 1,7%-át teszi ki. Elmondhatjuk, hogy ezek a fehérje gének nem csak az ember, de az eukarióták egyik legnagyobb géncsaládját alkotják.

A legtöbb humán kináz az eukarióta protein kináz katalitikus doménnel rendelkezők szupercsaládjába tartozik (ePK), számszerint 478 gént soroltak ebbe a családba. További 40 gént a nem-tipikus protein kinázok közé soroltak (aPK). Ezek a fehérjék biokémiailag kináz aktivitást mutatnak, ám doménjeik szekvenciája és struktúrája kevésbé mutat hasonlóságot az ePK csoportba tartozó fehérjék doménjeivel, de azok homológjainak tekintik őket. Az 518 darab azonosított protein kináz gén mellett 106 pszeudogént is találtak, melyek az ePK vagy aPK csoportokhoz hasonlóságot mutatnak, de nem szintetizálódnak róluk géntermékek, vagy rendkívül degenerált fehérjék fejeződnek ki róluk.

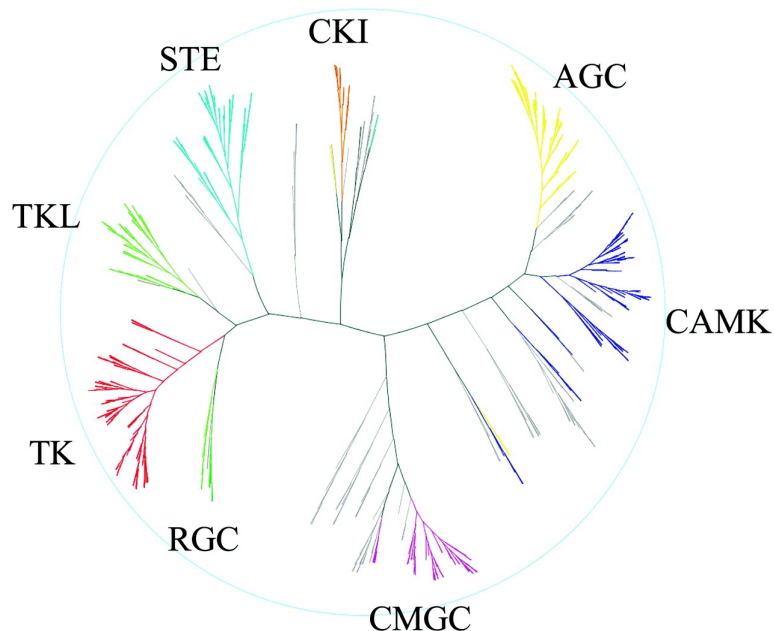
A kinázok csoportosításának alapjául a katalitikus doménjeik szekvenciáit vették alapul(24). Ennek alapján egy olyan hierarchikus rendszert hoztak létre, melyben először 5 nagy csoport, 44 család és 51 alcsalád foglalt helyet, majd 4 nagyobb csoport hozzáadásával a családok száma 90-re, míg az alcsaládok száma 145-re emelkedett(25).

Manning és munkatársai által az emlős kinázok osztályozása a következőképpen alakul. Az első nagy csoport az AGC nevű csoport. Ezen belül megkülönböztetjük a ciklikus-nukleotid és a foszfolipid függő kinázok (PKC) családjait, valamint a  $\beta$ -adrenerg receptor kinázok és riboszómális S6 kinázok csoportja is ide tartozik. Az első családba tartoznak a cAMP (PKA) és cGMP (PKG) függő kinázok alcsaládjai. A következő nagy csoport a CaMK, amelyen belül a Ca/calmodulin függő kinázok családja alkotja a csoport legnagyobb hányadát. De szintén ebbe a csoportba tartozik az AMPK (AMP-aktivált kináz) család tagjai is. A harmadik csoport igen változatos CMGC csoportnak vagy gyakran prolin irányított kinázoknak is nevezik őket, mert sokszor a foszforilálható szerin vagy treonin aminosav mellett prolin helyezkedik el a szubsztrátjaikban. Ide sorolhatók a ciklin-függő kinázok (CDK), a ciklin-függő kinázokhoz hasonló kinázok (CDK like), a mitogén aktivált protein kinázok (MAPK), valamint a glikogén szintáz 3 kinázok (GSK3) családja is. A tirozin kinázok (PTK) alkotják a következő csoportot, amelyen belül 23 családot különböztetünk meg, és így egy igen diverz társaságról beszélhetünk. Hozzá közeli rokonságban áll a tirozin szerű kinázok (TKL) nagy csoportja, valamint a Receptor Guanil-ciklázok (RGC) csoportja. Az RGC csoport transzmembrán fehérjéi katalitikusan inaktív kináz doméneket tartalmaznak, amelyek a guanil cikláz domének szabályozásáért felelősek. Az újabb osztályozás szerint a STE csoport tagjai, amelyeket régen egyik nagy csoportba sem soroltak, a MAP kináz kaszkádban részt vevő fehérjék (MEK, MEKK). Valamint szintén, most már nagy csoportként

számon tartott kazein kináz I. (CK1) csoportot is meg kell említeni, amely a többihez képest nem tartalmaz sok enzimet (**2. ábra**)(26).

Szekvencia analízisek rámutattak, hogy 50 humán kináz domén (ePK) katalitikus oldalláncai hiányoznak, és ezeket ezáltal enzimatikusan inaktívnak jósoltak. Tehát valószínűsíthető, hogy ezeknek a fehérjéknek a doménjei nem a katalízisben vesznek részt, vagy, hogy olyan módosult katalitikus mechanizmusokkal látják el a feladataikat, melyekhez nincs szükség ezekre a konzervált aminosav oldalláncokra. Ezt az 50 „inaktív” kinázt három csoportba sorolják. Az elsőbe azok a fehérjék tartoznak, amelyek doménjei regulátor funkciót láthat el. Ilyen például a JAK kináz család, mely két darab ePK doménnel rendelkezik, és ebből az egyik a katalitikus folyamatokért felelős, a második pedig az aktív domén szabályozását végezheti. A második csoportba fehérje-fehérje interakciókat biztosító platform fehérjék, ún. állvány fehérjék tartoznak. Például ebbe a csoportba tartozik a Raf pályák KSR alloszterikus aktivátorai is. Az utolsó csoport tagjai igen kis mértékű hasonlóságot mutatnak az ePK domén struktúrákhoz, de ennek ellenére számos tagjuk (Bub1, VRK1, PRPK) katalitikusan aktív.

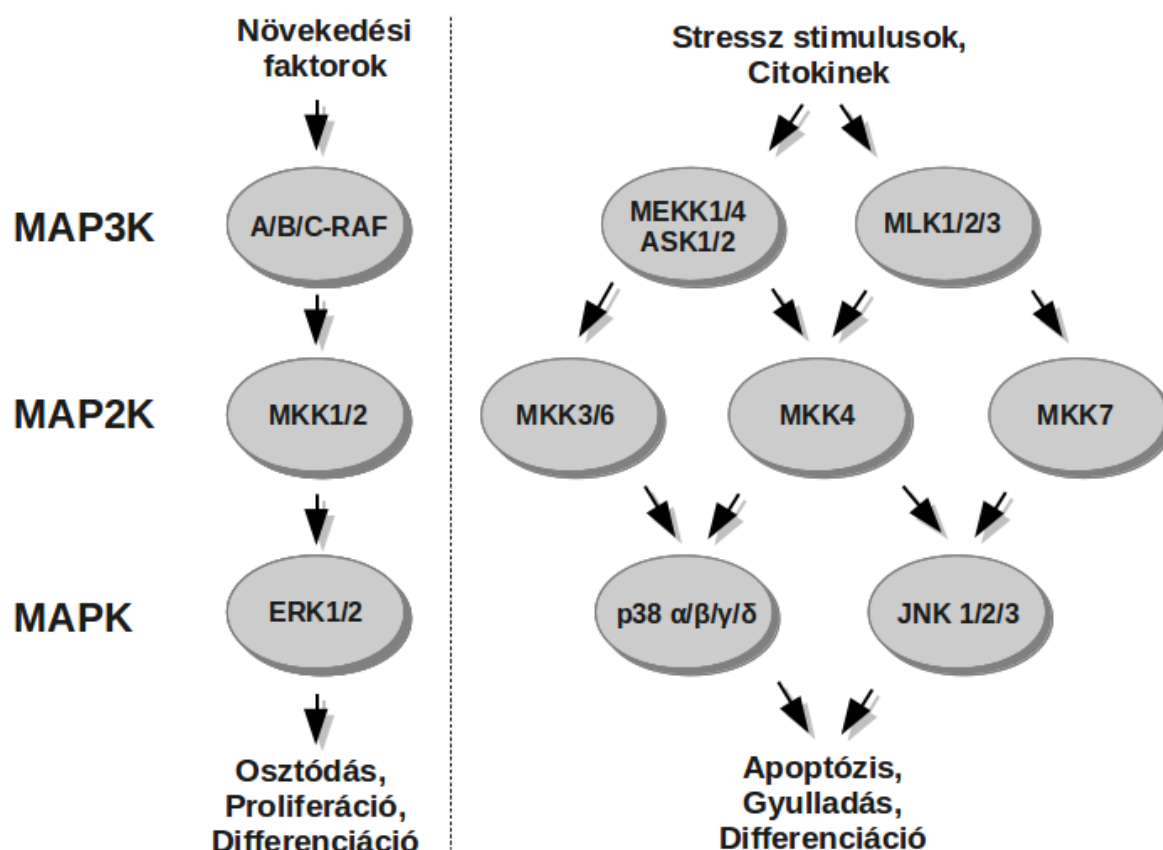
A kinázok hálózatában fontos tényező a szabályozhatóság, ezért a protein kinázok jelentős hányada a katalitikus domén mellett, olyan doménnel is rendelkezik, melyeknek a fehérjék aktivitásának szabályozásában van kiemelkedő szerepük. 83 különböző ilyen domén típust azonosítottak, melyek 258 kinázban fordulnak elő. Ezek a domének egyrészt a sejten belüli lokalizáció szabályozásával, másrészt jelátviteli elemek kötésével segítik a kinázok megfelelő működését. Ezek a szabályozásban fontos elemek lehetnek más fehérjék (citoszkeletális fehérjék, receptorok), RNSeK, lipid típusú molekulák, GTP, kalcium/kalmodulin és foszforilált tirozin oldalláncok. Sejten belüli elhelyezkedésük szempontjából számos kináz a sejtmembránokhoz közel található, míg a legtöbb a citoplazma és a sejtmag körül lokalizálódik. Csupán három kináz célpontja az endoplazmatikus retikulum, és csak 5-6 darab mitokondriális(25).



**2. Ábra)** Az emberi kinom dendogramjának sematikus ábrázolása. A főbb csoportok különböző színnel kiemelve láthatóak(25).

### 2.3 A Mitogén Aktivált Protein Kinázok általános jellemzői

Doktori értekezésem főszereplői a Mitogén Aktivált Protein Kinázok (MAPK) szerin/treonin/tirozin specifikus kinázok, amelyek a CMGC kináz csoportba tartoznak(25). A MAPK-ok számtalan fiziológiás szerepben vállalnak fontos szerepet, amelyek során az enzimek egy három tagból álló kaszkád modulban végzik feladatukat(27). A modul legalsó tagja egyben a jelpálya névadó kináza is, így megkülönböztetünk 4 klasszikus MAP kináz útvonalat. Ezek sorrendben ERK1/2, JNK, p38 és ERK5 jelpályák. Az őket aktiváló fehérjék, azaz MAPK kinázok (MAP2K) azonos sorrend mentén a MKK1/2, MKK4/7, MKK3/4/6 és MKK5 nevet viselik. A legfelső szintet a szerkezetileg igen diverz MAPK kináz kinázok (MAP3K) alkotják (3.ábra) (28)(29).



**3. ábra)** A három klasszikus MAPK kaszkád és fiziológias feladataik sematikus ábrázolása.

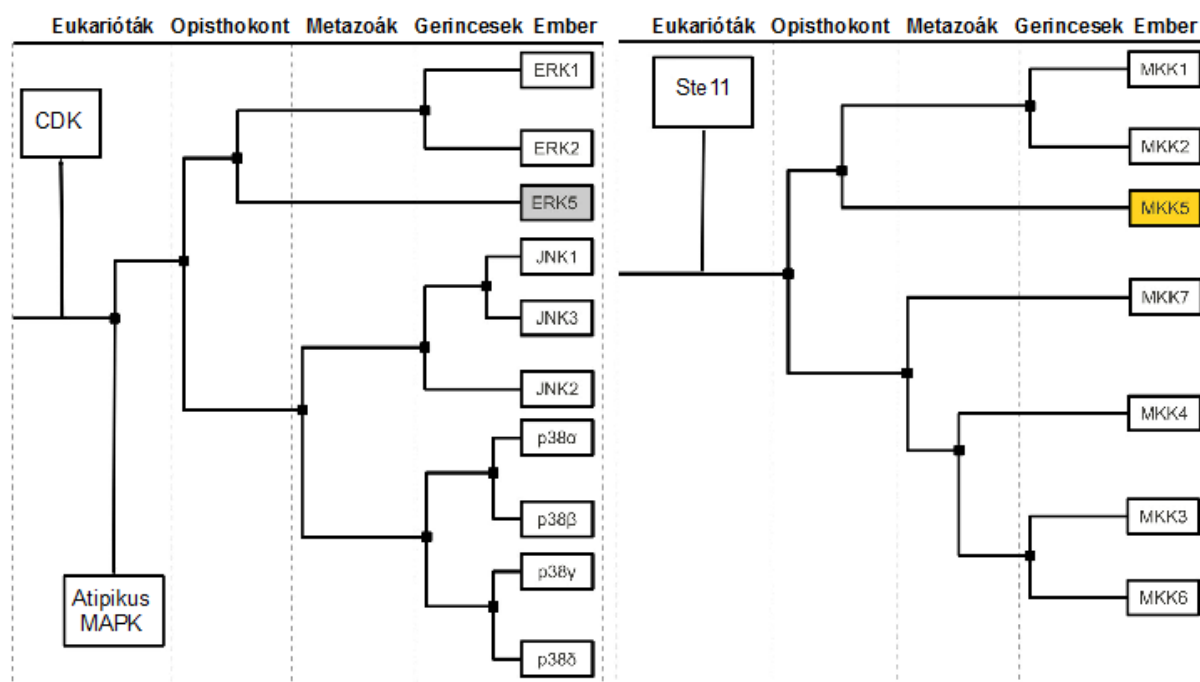
A legjobban karakterizált MAPK útvonal az ERK1/2 (Extracellular-signal-regulated kinase) jelpálya, ami különböző növekedési faktorok hatására indul be (EGF, FGF, stb.) és számos fiziológiai folyamatban játszik szerepet, például: sejtosztódás, proliferáció, differenciáció. Az ERK1/2 útvonal legfelső aktivátorai közé a RAF fehérjék tartoznak (A-RAF, B-RAF és c-RAF), melyek a MKK1/2 fehérjék felfoszforylálásán keresztül aktiválják a kinázokat(30)(31)(32)(33). Az ERK1 és ERK2 fehérjék mind szerkezeti, mind fiziológias szempontból nagy mértékben hasonlóak, például az ERK1 kiütése (pl.: géncsendesítéssel) nem eredményez patológias elváltozást, mert a ERK2 fehérje képes annak szerepét átvállalni(34)(35).

A JNK kinázok (c-jun N-terminal kinase), melyek között három altípus (JNK1, JNK2, JNK3) található(36), főképp különböző stressz stimulusokra aktiválódnak. Ilyen inger lehet UV sugárzás, különböző oxigén gyökök, hősokk vagy ozmotikus sokk, de a JNK-k a T-sejtek szaporodásában és más sejtek apoptikus és gyulladásos folyamataiban is részt

vesznek(37)(38)(39). A JNK1 és 2 minden sejtípusban és szövetben előforduló fehérje, míg a JNK3 kizárólag az agyban, a szív izomszövetében valamint a herékben található meg(36). A JNK jelpályáknak számos MAP3K aktivátora van, amelyek az MKK4 vagy MKK7 MAP2 kinázokat foszforilálják(40)(41)(42).

A p38 családba tartozó fehérjék (p38 $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ ) a JNK kinázokhoz hasonlóan, főképp stressz válaszokban vesznek részt (ultraibolya, ozmotikus, hősokk), de emellett igen fontos szerepük van a különböző citokin-függő jelpályákban és ezzel kapcsolatban autofágiás és apoptikus folyamatokban(43)(44)(45)(46). A JNK és p38 útvonalak felső aktivátorai között sok az azonos elem, a MAP3K szinten például a MLK3, TAK1, MEKK1 és MEKK4, valamint az eggyel lejjebb található MAP2K szinten is a MKK4 kináz esetében. De a p38 jelpályák unikális aktivátorai az MKK3 és MKK6 fehérjék (47)(48).

A egyes kaszkád azonos szintjén belül található fehérjék evolúciósan közeli rokonságban állnak egymáshoz, mivel az egyes MAPK pályák az útvonal teljes duplikációjával alakultak ki, ebből eredendően kináz doménjeik szerkezete igen nagy hasonlóságot mutat egymással (**4. ábra**) (22). Katalitikus aktivitásuk specificitását a klasszikus kulcs-zár elmélet nem biztosítaná, mivel az enzim aktívhelyének szubsztrát felismerő képessége nem biztosít megfelelő megkülönböztetést az egyes partner fehérjék felé. A MAP kinázok szubsztrát felismeréséhez elegendő, hogy a foszforilálandó treonin vagy szerin mellett egy kisméretű aminosav, leginkább egy prolin található. Ennek a tulajdonságnak a kiküszöbölésére a MAPK kaszkádokra jellemző, hogy a megfelelő szubsztrát felismerést lineáris motívumok biztosítják ún. dokkoló interakciókon keresztül(49).



**4. Ábra)** Az ábrán a MAPK-ok és MAP2K-ok kladogramja látható. Megfigyelhető, hogy mind az ERK2-ERK5 pár, mind az MKK1-MMK5 közeli rokonságban áll egymással. A rokonsági viszonyok a kináz domének szekvencia hasonlósága alapján vannak feltüntetve.

Szerkezeti szempontból vizsgálva a MAPK kináz-doménjének aktív helyhez képest átelleni oldalán egy ún. dokkoló árok található, ami egyrészt tartalmaz egy hidrofób zsebet, valamint közel hozzá egy negatív aminosavakkal „kibélelt” ún. CD-árkot. Ebbe az árokba fekszik bele a partner molekula 8-12 aminosav hosszúságú lineáris motívuma, amit az irodalom dokkoló-motívumnak (D-motívum) hív. A különböző D-motívumok az árok kémiai tulajdonságának megfelelően hidrofób, valamint pozitív aminosavakból álló részekkel bírnak, általános konszenzus szekvenciájuk a következő:  $\Psi_{1-3}X_{3-7}\Phi X\Phi$ , ahol  $\Psi$  pozitív,  $\Phi$  hidrofób, míg X bármely aminosavat jelöli. Érdemes megemlíteni, hogy a MAPK által aktivált kinázok csoportjánál (MAPKAPK) a szekvencia fordított, ún. reverz D-motívum (50).

A MAPK szubsztrátokon és az őket inaktíváló foszfatázokon kívül, a MAP kinázokat aktiváló MAP2K-k is rendelkeznek D-motívummal. A MAP kinázok aktiválódásának szerkezeti jellemzője, hogy a fent felsorolt MAP2K enzim a fiziológias szubsztrátját foszforilálja annak aktivációs hurkán. Az aktivációs hurkon található TxY motívum jól konzervált a MAPK-ok között (ERK1/2-ben a szekvencia TEY, ERK5-nél TDY, JNK-nál

TPY, végül a p38 esetén TGY). A korábban említett dokkoló interakciók a MAP2K-MAPK jelátmenetekben is abszolút jelentőséggel bírnak, a D-motívumától megfosztott MAP2K nem, vagy csak alig képes foszforilálni szubsztrátját(50)(51).

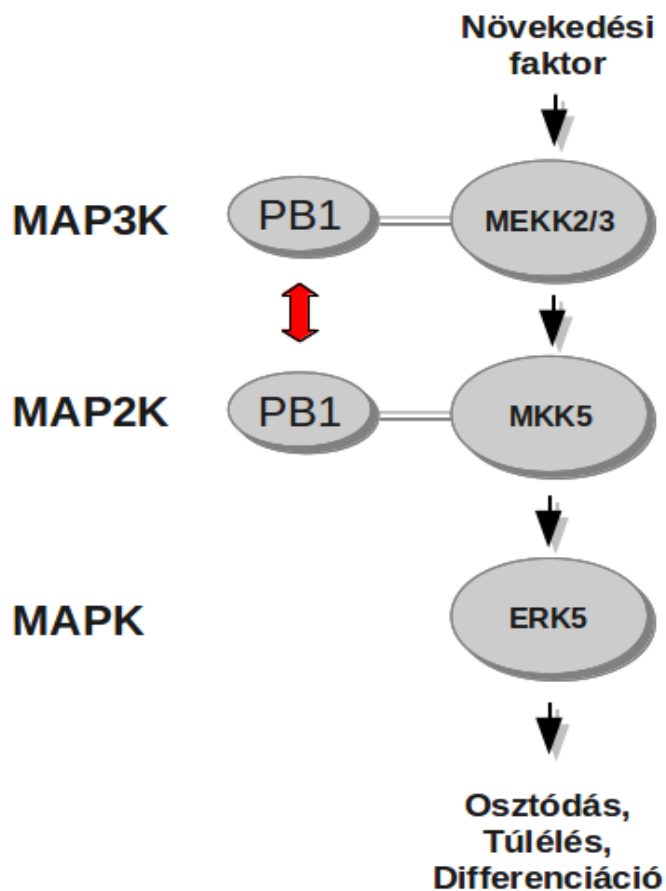
Érdemes megemlíteni, hogy a MAPK kaszkádokra jellemző, hogy egy jelpályákon belül a különböző szinteken található kinázokat ún. állvány-fehérjék szabályozák mind allosztérikusan, mind a sejten belüli lokalizáció által. Például az ERK1/2 útvonalban a b vagy c-RAF, MKK1/2 és ERK1/2 fehérjéket két ilyen állvány-fehérje, a KSR1 és 2 is képes összeszerelni és befolyásolni annak MAP3K aktivitásán keresztül az útvonalat(52)(53). De a JNK útvonalban is megfigyeltek hasonló mechanizmust: itt a MLK3, MKK7 és JNK kinázokat köti össze a JIP (JNK Interacting Protein) fehérje(54)(55).



## 2.4 Az ERK5 jelpálya jellemzői

Az ERK5 jelpálya a negyedik a klasszikus MAPK kaszkádok közül. Főképp az érfal és neurális szövetek fejlődési folyamataiban vesz részt, azon belül is a sejtosztódás, -differentiáció és túlélésben tölt be fontos szerepet(56)(57)(58)(59). Az endothél kialakulás és szív-morfogenezisben betöltött szerepének fontosságát bizonyítja, hogy az erk5 KO egerekben nem alakul ki az érhálózat és emiatt embrionális korban meghalnak, valamint kondicionált KO egerek felnőtt korban is elpusztulnak, mert az endothél gátak feloldódnak és ödémában elhal az állat(60)(61).

Az útvonalat különböző növekedés faktorok képesek stimulálni (pl.: NGF, VEGF) és a kaszkádon belül a MEKK2/3 és MKK5 kinázokon keresztül aktiválódik az ERK5 (5.ábra) (62)(63)(64). Az ERK5 fiziológias szubsztrátjainak sora nem annyira ismert, mint például a jobban kutatott ERK2 kinázé. A legjobban karakterizált partnerek a MEF2 transzkripció faktor (Myocyte Enhancer Factor 2) család fehérjéi (MEF2A, -C, -D)(65)(66)(67).



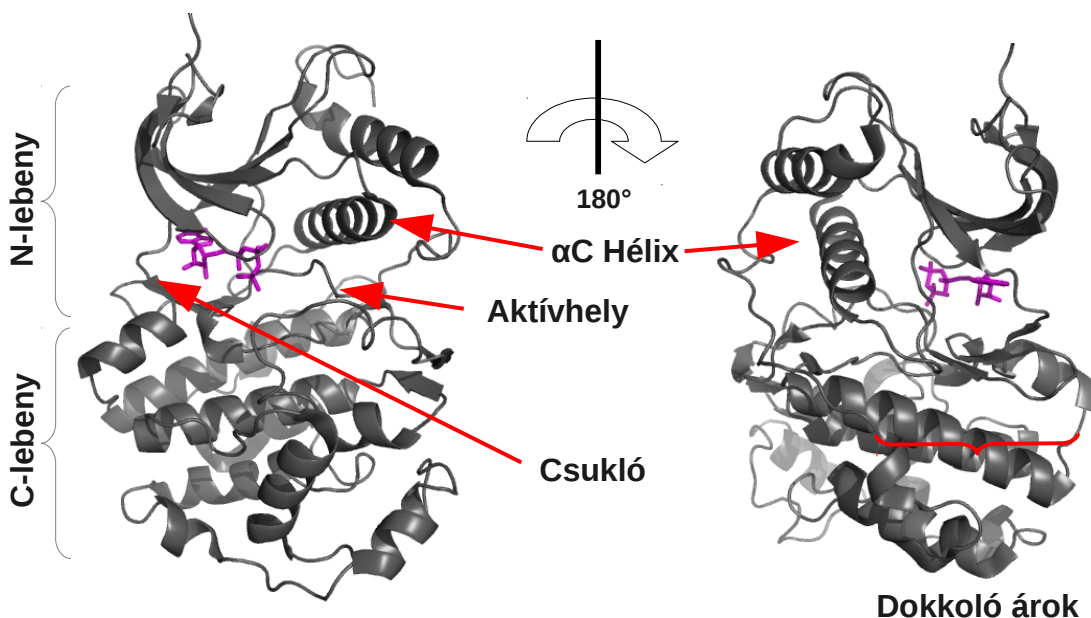
**5. Ábra)** Az ERK5 jelpálya sematikus ábrázolása. A környezetből érkező ingerek hatására a felső aktivátorok aktiválják a MEKK2/3 kinázt, ami az MKK5 foszforilációján keresztül aktiválja az ERK5 kinázt. Az MEKK2/3-MKK5 átmenethez elengedhetetlen a két PB1 doménen keresztüli kölcsönhatás (piros nyíl).

Az ERK5 jelpálya elemei sok esetben tartalmazznak egyedi szerkezeti elemeket a hozzá legközelebbi rokon ERK1/2 pálya elemeihez képest(68). Az ERK5 másik neve BMK1 (Big MAP Kinase), ami onnan ered, hogy a kináz a többi MAPK-hoz képest jóval nagyobb (816 aminosav hosszúságú, az átlagos 350-400 aminosavhoz képest). A fehérje a kináz doménjén kívül tartalmaz egy kb. 400 aminosav hosszúságú, főképp rendezetlen részt, amit az irodalom transzkripció ko-aktivátor régióknak hív. Ebben a szakaszban található egy NLS (sejtmagi lokalizációs szignál), amely az ERK5 saját szabályozása alatt áll(69)(70). A ma leginkább elfogadott hipotézis szerint a felaktivált kináz, a C-terminálisán található NLS melletti tirozinokat foszforilálva „kinyitja” azt és ezáltal képes a sejtmagba bejutni és ott a végső fiziológias választ indukálni(71).

A ERK5-t aktiváló MKK5 is kivételes szerkezeti szempontból a többi MAP2K-hoz képest, mivel a katalitikus doménjéhez képest N-terminális irányban található rajta egy fehérje-fehérje interakciót biztosító Phox/Bem 1 (PB1) domén. Hasonló domén található az MKK5 aktivátorain is, a MEKK2 és MEKK3 kinázokon. A PB1 domének kb. 90 aminosav hosszú, kompakt, globuláris domének, enzim aktivitásuk nincs. Három típusukat különböztetjük meg, amely kategorizálás a kölcsönható felszínek kémiai tulajdonságát tükrözi. A PB1 domének egymással heterodimerizáció révén kötődnek. Az interakció főképp ionos-kölcsönhatásokon keresztül megy végbe, ezért megkülönböztetünk A- (acidic, savas), B- (basic, bázikus), illetve AB-típusokat. A fent említett kinázok esetében, a MAP3K enzimek (MEKK2/3) B-típusú, míg az MKK5 A-típusú PB1 doménnel rendelkeznek, amelyek tehát a bázikus, illetve savas jellegű felszíneiken keresztül hatnak kölcsön egymással(64)(72). Az MKK5 kináz két doménje között (PB1, ill. kináz domén) található rendezetlen összekötő (linker) szakaszon található a MAPK kaszkádokra jellemző D-motívum(73).

## 2.5 MAP Kinázok szerkezeti jellemzői

A már említett kináz csoportokban található enzimek katalitikus doménjei nagy mértékben hasonlóak, ebből adódóan a MAPK fehérjék kináz doménjének szerkezete is ezt a jól konzervált struktúrát mutatja(74). A következőkben a kanonikus ERK2 kináz doménjének aminosav számozását használok és ezen keresztül mutatom be a fontosabb domén régiókat (a felhasznált szerkezet PDB kódja: 4H3Q). A domén két szubdoménre választható szét, a kisebb N-terminális rész, másnéven N-lebeny, amely öt darab  $\beta$ -lemezt és egy kitüntetett  $\alpha$ -hélixet, másik nevén  $\alpha_C$  hélixet tartalmaz. A nagyobb C-terminális részt (C-lebeny) főként helikális szerkezet jellemzi. A két lebeny között egy összekötő „csukló” régió található (6. ábra).

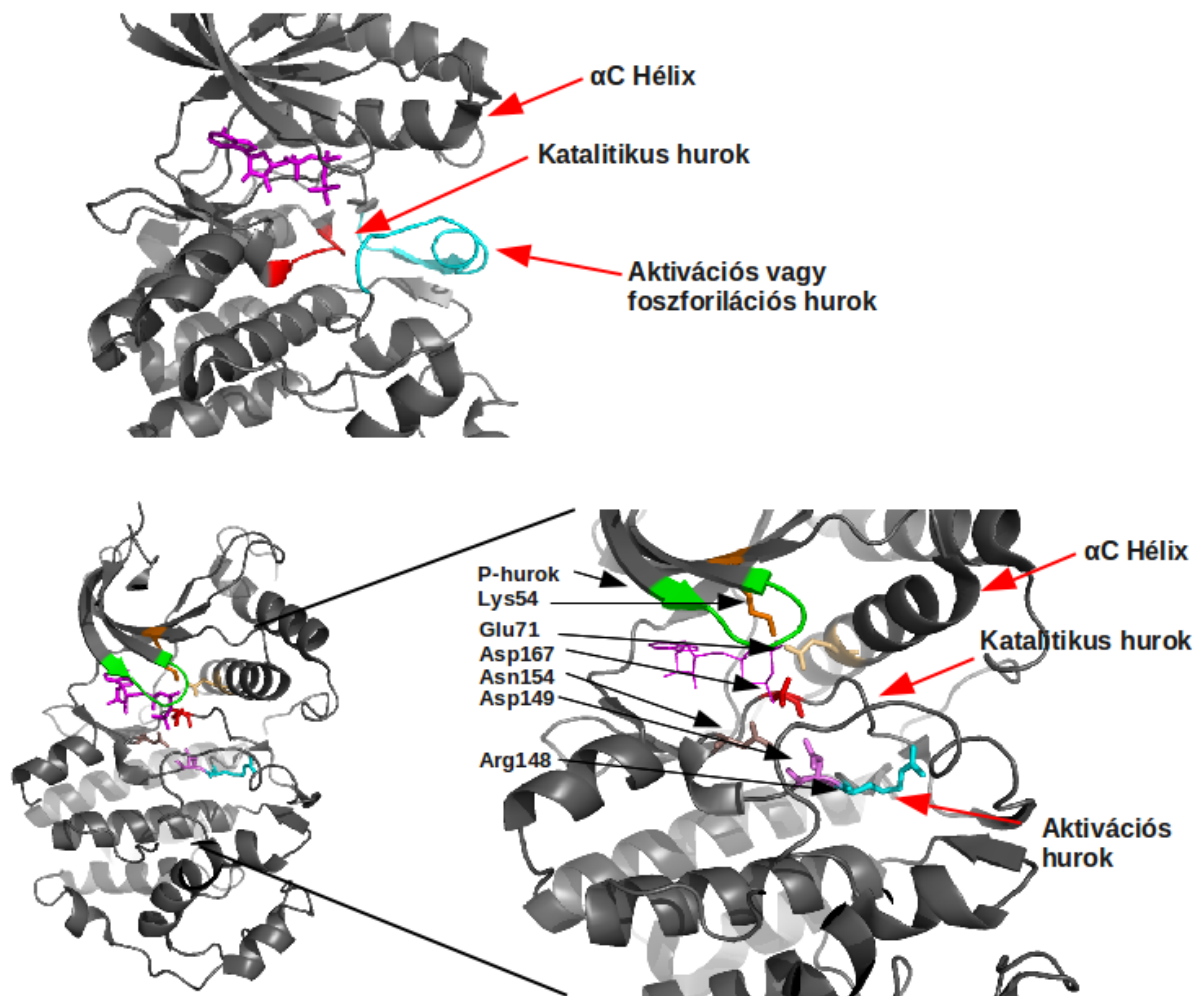


**6. Ábra)** A MAP Kinázok szerkezetének főbb jellemzői. A kináz domén két lebenyből és az őket összekötő csuklóból áll. Látható, hogy a kináz aktívhelyétől nézve a domén hátoldalán található a dokkoló árok. A szerkezetben (PDB kód: 4H3Q) a kristályosításhoz használt AMP-PNP bíbor színű pálcikával van feltüntetve.

Az ATP a két szubdomén közötti mély árokba kötődik, amely az N-lebeny  $\beta_1$  és  $\beta_2$  lemezeivel tart kapcsolatot. Ez a foszfát-kötő árok (P-árok) egy konzervált szekvenciájú glicin-gazdag motívumot tartalmaz. A szekvencia GXGX $\phi$ G, ahol a  $\phi$  főképp tirozin vagy

fenilalanin aminosavat jelent. A glicin aminosavak biztosítják, hogy a P-hurok hajlékony legyen, így az könnyen eléri az ATP foszfát-csoportját és koordinálja azt az interakcióhoz. Míg a motívum aromás aminosav oldalláncai a foszfortranszfer helyét fedik le. Számos kináz inhibitor ezekhez az aromás oldalláncokhoz kötve gátolja a fehérje működését(75).

A fehérje szubsztrát a nukleotid kötőzseb végénél, a  $\gamma$ -foszfát-csoporthoz közel köt a kinázhoz. Ezt a központi elhelyezkedésű árkot hívják aktivációs ároknak, amelyben 20-30 aminosavnyi hosszúságú platform biztosítja a szubsztrát kötődését. A legtöbb kináz esetén, ez az árok közelében lévő aktivációs hurok foszforilált állapotban van, mikor a kináz aktív. A foszforiláció stabilizálja és nyitva tartja a hurkot, így biztosítva azt a konformációt, amely a szubsztrát fehérje kötéséhez szükséges. Az optimális foszfortranszfer mechanizmushoz elengedhetetlen egyes katalitikus aminosav oldalláncok megléte(76). Ezek az oldalláncok tökéletesen konzervatívak az összes ma ismert kinázban. Az aktivációs árok alapjánál, amit katalitikus ároknak nevezünk, két kiemelt aminosav található: egy aszpartát (Asp149) és egy aszparagin (Asn154), melyek közül az előbbi a szubsztrát fehérje támadó hidroxil-csoportjával hoz létre kötést, míg a második az aszpartátot irányítja hidrogén-hídon keresztül. Emellett az Asn154 és egy másik aszpartát (Asp167) feladata, hogy közvetlen vagy magnézium ionokon keresztül, közvetett módon koordinálja az ATP foszfát csoportjait(77)(78). Ez utóbbi aszpartát egy igen konzervatív motívum, az Asp-Phe-Gly tagja. Ez a szekvencia motívum az aktivációs árok alapjánál található és struktúrája erősen függ az árok foszforiláltságától. Az N-terminális szubdomén,  $\beta_3$  lemezén található lizin (Lys54) aminosav is kitüntetett szereppel bír. Az ATP  $\alpha$ - és  $\beta$ -foszfát-csoportjával hoz létre kötést, ezáltal pozicionálva a molekulát a katalízishez, valamint ionos-kötéssel kapcsolatban áll az  $\alpha$ C hélix egy glutamátjával (Glu71), amely ezáltal stabilizálja és irányítja a megfelelő működés eléréséhez (7. ábra).

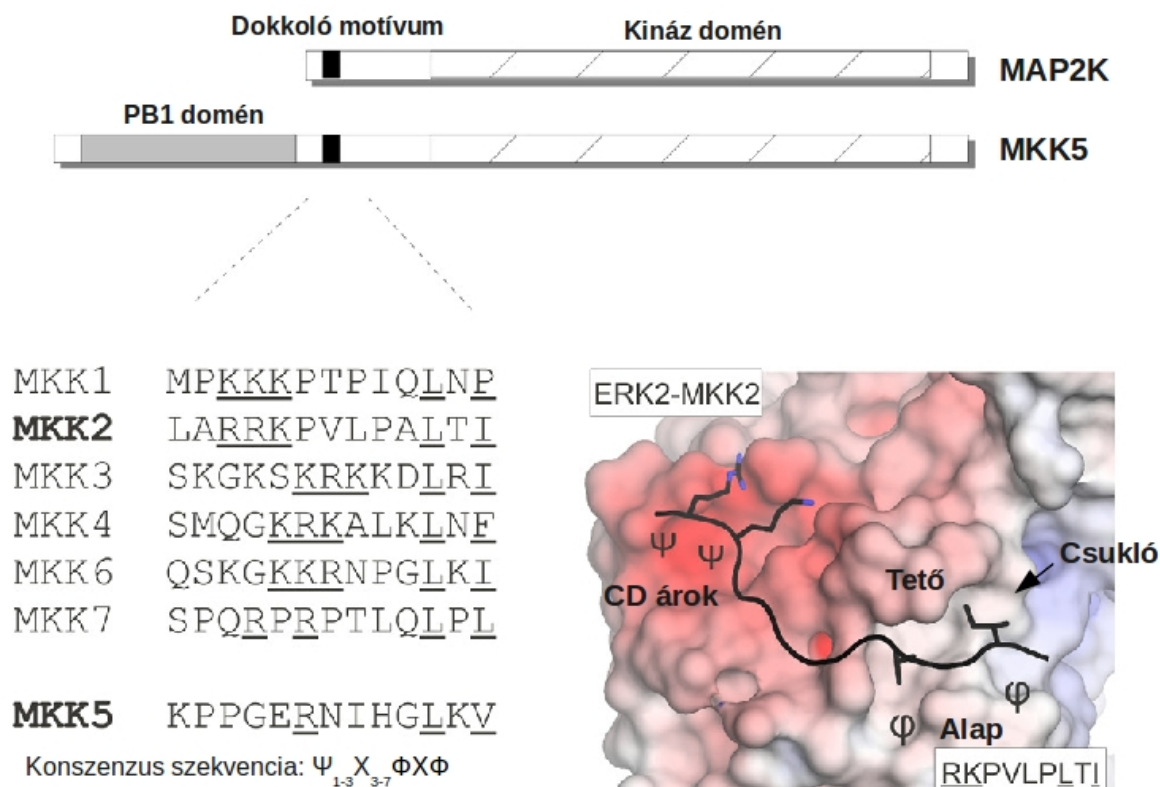


7. **Ábra)** Az MAPK kináz domének aktívhelye. A felső ábrán pirossal a katalitikus, míg ciánkék színnel a foszforilációs hurok látható. Az alsó ábrán a katalízishez szükséges fontosabb régiók és aminosavak vannak feltüntetve az ERK2-ben található számozás szerint: P-hurok (zöld), Lys54 (narancs), Glu71 (vajszín), Asp167 (piros), Asn154 (barna), Asp149 (lila), Arg148 (ciánkék). A szerkezetben (PDB kód: 4H3Q) a kristályosításhoz használt AMP-PNP bíbor színű pálcikával van feltüntetve.

A kináz aktivációja során az aktivációs hurok foszforilálódik, mivel ha ez nem történik meg, maga a hurok az aktív hely mélyén található, ezáltal blokkolva a nukleotid és a fehérje szubsztrát kötődését. A foszforiláció során tehát a hurok olyan konformáció változáson esik át, amely után a két szubsztrát kötődni képes és a katalízis végbe tud menni. Ez a konformáció változás végső soron az aktivációs árok Asp-Phe-Gly szekvencia irányultságát változtatja meg. Az aktivációhoz szükséges foszfát-csoportok száma kinázról kinázra változik, de

általánosságban elmondható, hogy egy központi elhelyezkedésű foszfát-csoport mindig található, amely egy, a katalitikus árokban található konzervatív argininnal ionos-kötés segítségével elmozdítja az Asp-Phe-Gly motívumot. Az  $\alpha$ C hélixnek is kitüntetett szerepe van az aktiváció során bekövetkező konformáció változásban. A hélix kapcsolatban áll az aktivációs árok N-lebeny felőli részével, valamint a már fent említett lizin-glutamát (Lys54-Glu71) kapcsolat által közvetve az ATP-vel. Ezáltal ha a P-hurokba bekötődik az ATP és annak  $\alpha$ - és  $\beta$ -foszfát-csoportjával sóhidat képez a lizin, a glutaminsavval való kapcsolatán keresztül elmozdítja az  $\alpha$ C hélixet. A hélix és az aktivációs árok közötti kapcsolat végső soron pedig az Asp-Phe-Gly motívum elmozdulását eredményezi(79).

A MAP Kinázok másik fontos szerkezeti régiója a dokkoló árok, amely a C-lebenyen található, a kináz aktívhelyétől nézve a „hátdalón”. Az árok több részből épül fel, az első a negatív aminosavakból felépülő CD-árok (Common Docking groove), ahova a partner molekula dokkoló motívumának pozitív töltésű része kötődik. A másik kiemelt régió a hidrofób  $\phi$ -x- $\phi$  árok és a mellette található hidrofób felső és alsó zseb (**8.ábra**) (80)(81). A hidrofób régiót három fontos szerkezeti elem határolja: az alap, a tető és a két lebenyt összekötő csukló. Ezen részek aminosav összetétele valamint a CD-árok töltöttsége változó az egyes MAPK-ok között, és döntő szerepük van a fiziológiás partnerkötődések specificitását illetően(50)(82)(83).

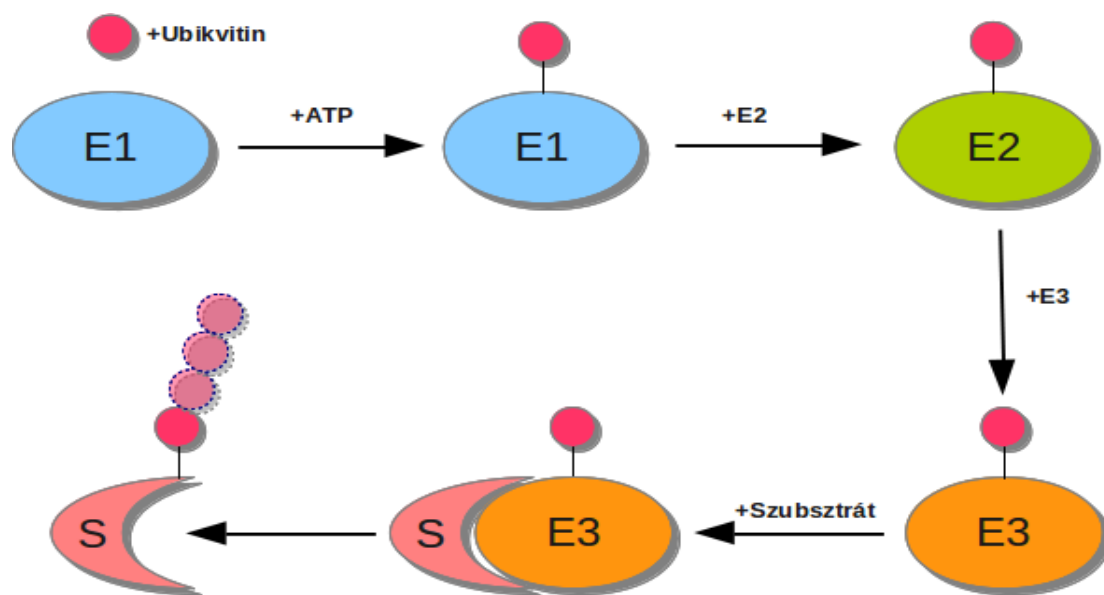


**8. Ábra)** Az MAP2K fehérjék felépítésének, sematikus ábrázolása, valamint dokkoló motívumaik szekvenciái. Az enzimek kináz doménjétől N-terminálisan található a dokkoló motívumuk (MKK5 esetén még a PB1 domén is). A kép jobb oldalán az ERK2 dokkoló árok felszíni ábrázolása, benne az MKK2 dokkoló motívumának megfelelő peptid. Az ábra piros felszínnel a negatívan töltött CD-árkot és benne helyet foglaló két pozitív aminosavat mutatja, míg tőle jobbra a hidrofób árok és az abba bekötődött hidrofób  $\Phi X \Phi$  motívum látható. A hidrofób régiót három fontos szerkezeti elem határolja: az alap, a tető és a két lebenyt összekötő csukló.

## 2.6 A nem-proteolitikus ubikvitináció jellemzői

Az ubikvitináció az eukarióta szervezetekben található jól konzervált, gyakori reverzibilis poszttraszlációs módosítás a foszforiláció mellett. Légyege, hogy kisméretű (8.6 kDa) ubikvitin fehérjék „jelölik meg” a célfehérjét és befolyásolják annak sejtben található koncentrációját (proteolitikus ubiquitináció) vagy aktivitását, esetleg lokalizációját (nem-proteolitikus ubiquitináció)(84)(85)(86)(87). A folyamat egy három lépcsős mechanizmuson keresztül megy végbe. Az első enzim az ún. E1 fehérje, amely ATP hidrolízis segítségével felaktiválja az ubikvitin monomereket, és végeredményben tioészter kötést hoz létre az ubikvitin C-terminális glicinjének karboxil csoportja és az enzim katalitikus ciszteinjének tiol-csoportja között(88). A második lépésben az E1 és ubikvitin komplexet az ún. E2 ubikvitin-konjugáló enzim köti, és végeredményben a fehérje katalitikus ciszteinjére kerül át a monomer(89). A végső folyamatban végül az ún. E3 ligáz enzim köti a célmolekulára a fehérjét az E2-ubikvitin komplexből. Az utolsó lépésben a ligáz enzim a módosítani kívánt fehérje egyik lizinjére helyezi át a monomert, úgy hogy annak C-terminális glicinje és a célfehérje lizinje között izopeptid kötés alakul ki(90)(91). Az ubikvitináció során az egyes monomerekből ubikvitin polimer alakul ki, úgy hogy a továbbiakban már a soron következő elem glicinje a már beépült egy lizinjével alakít ki izopeptid kötést (**9. ábra**). A folyamat reverzibilitását a különböző deubikvitináló fehérjék biztosítják.





**9. ábra)** Az ubikvitináció folyamatának sematikus ábrázolása. A folyamat során az ubikvitint (piros) az E1 enzim (kék) ATP hidrolízis mellett köti, majd átadja azt az E2 ubikvitin konjugátornak (zöld), amely az utolsó enzimre, az E3 (narancs) helyezi a monomert. Az E3 végső soron pedig a célmolekulára (lazacszín) köti a monomert, amelyen végül egy ubikvitinlánc alakul ki.

Az ubikvitinen 7 jól definiált lizin található (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), és ezek jól meghatározzák, hogy az ubikvitináció végül proteolitikus vagy sem. Például a 48-dik lizinen keresztül történő polimer kialakulás a leggyakoribb proteolitikus ubikvitináció, melynek végén a célfehérje a 26S proteoszómába kerül és ott lebontódik. A nem-proteolitikus ubikvitinációt főképp a 63-dik lizineken keresztül történő lánckialakulás jellemzi, de a polimer kialakulások végbe mehetnek több lizinen keresztül is, ilyenkor nem lánc, hanem egyfajta ubikvitin-háló alakulhat ki(92)(93)(94). A lánc jelenlétében bekövetkező különböző biológiai válaszok szerkezeti háttere, hogy a különböző módon kapcsolt polimerek topológiája különbözik és ez biztosítja, hogy a megfelelő folyamat indukálódjon. A polimer kialakulásának irányát az E3 enzim határozza meg, amelyből nem meglepő módon igen sok, több száz található a humán genomban. Az E3 ligáz rendelkezik egy, a két ligáz funkciót biztosító domén közül eggyel. Az egyik az ún. HETC (Homologous to the E6-AP Carboxyl terminus), a másik a RING (really interesting new gene) domén(95). Érdekességként

megemlítem, hogy az ubikvitináció folyamatában résztvevő enzimek száma nagyban különbözik, például míg az E1 enzimből csupán kettő található az emberi genomban, addig az E2 enzimből 35(89).

Doktori dolgozatomban szereplő E3 enzim az ún. X-linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP) egy jól ismert anti-apoptikus ubikvitin ligáz fehérje (IAP). Az első IAPokat baculovírusok tanulmányozása során fedezték fel, azóta több organizmusban, több fajtáját is megtalálták(96). A XIAP fehérje több doménből épül fel, ebből egyik a már fent megemlített RING domén, amely az ubikvitin transzferért felelős. A ligázon ezen kívül található még három, cink-ujj tartalmú kölcsönható BIR (Baculovirus of Inhibitor of Apoptosis Repeat) domén, amelyek az IAPok legfőbb strukturális elemei(97). Ezenkívül az utolsó BIR és a RING domén között található az UBA régió, amely az ubikvitin kötésért felelős domén. Az UBA domén és az ubikvitin kölcsönhatás egy hidrofób-hidrofób felszín kapcsolaton keresztül jön létre(98). A XIAP fő feladata, a virális vagy más behatás miatt indukált apoptózis effektorok, a kaspázok (kaspáz 3, 7 és 9) inaktiválása. A folyamat során a polimerlánc kaspázra való felhelyezése proteolitikus degradációt eredményez(99)(100). De ugyanezen elv alapján képes jelátviteli pályákat módosítani, például az ERK1/2 jelátviteli pályát, a RAF fehérjét is proteolitikus degradációba hajtja, így a csökkent MAP3K szint alacsonyabb ERK aktivitással jár együtt(101).

Takeda és munkatársai megmutatták, hogy a XIAP fehérje rendelkezik egy ERK5 aktiváción keresztül történő, humán vázizom mioblaszt sejtvonal (human primary skeletal myoblast, HSM) differenciálódást szabályozó funkcióval is. A kutatócsoport a HSM sejtvonal több génkiütéses mutánsán figyelte a különböző fejlődési szakasz során megjelenő markerek szintjét. Ilyen marker a MEF2C, a MHC és p21 fehérjék kifejeződésének növekedése, illetve az izomcsövek kialakulása közben látható többsejtmagúság. Az ERK5 vagy a legfelső aktivátor (MEKK2) géncsökkentett sejtvonalakon látványosan csökkent a markerek kifejeződésének mértéke, míg a XIAP géncsökkentett sejtvonal esetén még a vadtypushoz képest is számottevő jel növekedés volt tapasztalható. Tehát elmondható, hogy a sejtes kísérletekből következik, a XIAP negatívan befolyásolja az ERK5 jelátviteli működését(102).

### 3. Célkitűzések

Doktori munkám során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy közel rokon fehérjék, nagyon hasonló szerkezettel, miképp képesek külön jelátviteli útvonalon belül megfelelően működtetni jelpályákat (ERK2 és ERK5 jelpálya). A rokon fehérje kinázok milyen szerkezeti tulajdonságai felelősek azért, hogy a jel tovább terjedése nem keveredik össze például két jelátviteli út között?

Valamint munkám során arra is kíváncsi voltam, hogy miképp képes szabályozódni a jelterjedés iránya, ahol két különböző (fiziológiás válaszáért felelős) jelpálya azonos felső aktivátoron osztozik. A JNK és ERK5 MAPK útvonalaknak ugyanis közös MAP3K-ai a MEKK2/3 enzimek.

A kérdések megválaszolásához a következő feladatokat tűztem ki célul:

- Az MKK5-ERK5 kölcsönhatás pontos feltérképezése kvantitatív módszerekkel
- Az MK5-ERK5 komplex szerkezet meghatározása
- A hasonló szerkezetű, de különböző funkcióval bíró ERK2 és ERK5 fehérjék atomi szintű összehasonlítása
- A közös MAP3K rendelkező útvonalak, az ERK5 és a JNK jelpályák közötti ubikvitin-függő jelátkapcsolás felderítése *in vitro*

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1 PCR

A PCR reakcióelegyet 50 µl térfogatban mértem össze a következőképp: 0,25 µl primer (100 µM), 10 µl GC puffer, 5 µl dNTP mix (2 mM, Fermentas), 1 µl DNS templát (~70 ng DNS/µl), 0,5 µl *Phusion Hot Start* polimeráz (2 U/µl, Finnzymes, #F-540L).

A program beállításai:

1. predenaturáció: 98°C x 30 másodperc	
2. denaturáció: 98°C x 30 másodperc	} 35 ciklus
3. annelláció: 55-65°C x 1 perc	
4. extenzió: 72°C x 20 másodperc	
5. végső extenzó: 72°C x 10 perc	

A PCR termékeket 1%-os agaróz TBE gélen futtattam meg. (TBE puffer: 90 mM Trisz, 90 mM bórsav, 2 mM EDTA, pH=8.0 és 35 ml folyékony gélhez 1 µl GelGreen (Biotium) festéket adtam).

### 4.2 Irányított mutagenézis

Az állandóan aktív és a dokkoló mutáns Mek5, valamint a kináz inaktív Erk5 konstrukciókat *QuikChange site-direct mutagenesis kit* segítségével állítottam elő.

A PCR reakcióelegyet 50 µl térfogatban mértem össze a következőképp: 1 µl mutációt tartalmazó primer (100 µM), 10 µl GC puffer, 5 µl dNTP mix (2 mM, Fermentas), 2 µl DNS templát (~70 ng DNS/µl), 1 µl *Phusion Hot Start* polimeráz (2 U/µl, Finnzymes, #F-540L).

A program beállításai:

1. predenaturáció: 98°C x 30 másodperc	
2. denaturáció: 98°C x 30 másodperc	} 16 ciklus
3. annelláció: 55-65°C x 1 perc	
4. extenzió: 72°C x 6 perc	
5. végső extenzó: 72°C x 10 perc	

A PCR reakciót követően a mutációt nem tartalmazó, metilált DNS szálat DpnI enzimmel távolítottam el. Az 50 µl reakcióelegyhez 1µl DpnI endonukleázt adtam és 1 óráig inkubáltam 37°C-on.

#### 4.3 Restrikciós endonukleáz kezelés

Az ERK5 és MKK5 konstrukciók elkészítéséhez BamHI (hasítóhely:  $G \sim GATC \wedge C$ ) és NotI (hasítóhely:  $GC \sim GGCC \wedge GC$ ) restrikciós enzimek segítségével emésztettem a pETMBP vektort.

50 µl végtérfogatban végeztem az első emésztést NotI-vel: 44 µl vektor (~60-70 µg/µl DNS), 5 µl BamHI (10X) puffer, 1 µl NotI (10 U/µl, Fermentas). A reakcióelegyet egy éjszakán át 37°C-on inkubáltam, majd a hasított vektort agaróz gélből tisztítottam.

A következő emésztés 2 órán át történt 37°C-on hasonló módon BamHI enzimmel (10 U/µl, Fermentas). Majd ehhez az elegyhez hozzáadtam 1 µl CIAP (1 U/µl, Fermentas) enzimet, amely a vektor 5' végéről eltávolítja a foszfát csoportot, így a vektor inszert nélküli ligációja kisebb valószínűséggel történik. Fél óra CIAP kezelés után 37°C-on, a kétszeresen hasított, CIAP kezelt vektor DNS-t ismét agaróz gélből tisztítottam.

A gélből izolált PCR termékek emésztéséhez szintén a BamHI, NotI restrikciós endonukleázokat használtam. 50 µl-es végtérfogatban a két enzimmel egyszerre végeztem a hasítást: 20 µl PCR termék (~40 µg/µl DNS), 5 µl BamHI puffer, 0,5µl BamHI, 1 µl NotI enzim. Egy éjjel át 37°C-on inkubáltam, majd másnap *Invitrogen PCR Purification Kit* segítségével tisztítottam a vágott PCR terméket.

#### 4.4 DNS tisztítása gélből

A PCR termékek és az emésztett vektor 1%-os agaróz gélen lettek megfuttatva preparáló zsebben. A mintákat 10 µl 6 x Loading Dye Solution (Fermentas) kezelővel kevertem össze és 5 µl O'GeneRuler 1 kb DNS létra (Fermentas; 0,1 µg/µl) mellett futtattam 40 percig, 90 mA áramerősségen. A futtatás során a PCR termékeket el tudtam választani a

különböző méretű egyéb, nem megfelelően átvírt fragmentektól. Az egy emésztésen átesett, lineáris vektort a nem megfelelően emésztődött DNS-től, a kétszeresen emésztett vektort (~4500 bp) pedig a kiesett inszerttől, ill. nem megfelelően hasítódott DNS-től tudtam elkülöníteni. A megfelelő vektor fragmentumokat és a PCR termékeket éles, steril szike segítségével vágtam ki kék fény fölött. A kivágott géldarabokból *Invitrogen Quick Gel Extraction Kit* segítségével nyertem vissza a DNS-t.

#### 4.5 Ligálás

A gélből tisztított, kétszeresen emésztett pETMBP vektort és a PCR-tisztított, szintén kétszeresen hasított inszertekből 2-2 µl-t megfuttattam 1%-os agaróz gélen, hogy megállapíthassam az inszert/vektor molarányokat. Ennek alapján számítottam ki a megfelelő térfogatokat a ligáláshoz szükséges 1:5-as vektor / inszert arány eléréséhez. A reakcióelegyeket 10 µl-es végtérfogatba állítottam össze. A negatív kontroll esetében nem tettem a reakcióelegybe inszertet. Ezt követően 5 percig inkubáltam a mintákat 80°C-on, majd jégre raktam hűlni 2 percre. Ez után minden egyes elegyhez hozzáadtam 1 µl ligáz puffert (Fermentas) és 0,5 µl T4 ligázt (1 U/µl, Fermentas).

A mintákat 1 óráig 20°C-on inkubáltam.

#### 4.6 Transzformálás és a sejtek növesztése

Az 2 µl ligált mintákhoz hozzáadtam 8 µl KCM oldatot (0,5 M KCl, 0,25 M MgCl<sub>2</sub>, 1 M CaCl<sub>2</sub>) és kiegészítettem 30 µl vízzel, hogy a végtérfogat 40 µl legyen. Ehhez a reakcióelegyhez hozzákevertem 40 µl-t az előzőleg jégen felolvasztott *Escherichia coli* (XL1-Blue) kompetens sejtekből. Az elegyet jégen 20 percig, majd szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltam.

Ezt követően hozzáadtam 100 µl, antibiotikummentes LB tápoldatot (10 g Tripton, 5 g élesztőkivonat, 10 g NaCl 1 liter vízben feloldva, pH=7.5) a kompetens sejtet tartalmazó oldathoz, és 37°C-on rázattam 30 percig. Majd karbenicillin tartalmú LB-lemezekre (10 g

Tripton, 5 g élesztőkivonat, 10 g NaCl, 25 g agar, 50 µg/ml karbenicillin 1 liter vízben feloldva, pH=7.5) szélesztettem a mintákat, és egy éjszakán át inkubáltam 37°C-on.

Másnap reggel ellenőriztem, hogy a kontroll lemezhez képest a megfelelő DNS-t tartalmazó baktériumos lemezeken több telep nőtt-e ki (kb. tízszeres). Ha ez megfelelőnek bizonyult, akkor leoltottam mind a három lemezről 2-3 db különálló telepet 15 x 3 ml karbenicillint (50 µg/ml) tartalmazó LB- tápoldatba. A kémcsöveket egy éjszakán át rázattam 37°C-on.

#### **4.7 Miniprep készítés és ellenőrzés**

A másnap reggelre felnőtt sejteket Eppendorf-csövekben lecentrifugáltam, hogy megszabaduljak a médiumtól. A DNS konstrukciókat az *Invitrogen Quick Plasmid MiniPrep Kit* segítségével izoláltam.

A DNS mintákat 1%-os agaróz gélen futtattam meg, hogy ellenőrizsem az izolálás sikerességét. Majd visszaemésztettem azokkal a restrikciós endonukleázokkal, amelyekkel eredetileg a vektort, és az inszerteket hasítottam. Egy mintához a 10 µl-es reakcióelegy összetétele a következő: 4,25 µl víz, 4 µl miniprep, 1 µl puffer, 5-10 U restrikciós enzimek. Kontrollként inszertet nem tartalmazó vektort használtam. A mintákat 37°C-on inkubáltam 2 óráig. Ezután 1%-os agaróz gélen megfuttattam mintákat, és kiválasztottam azokat a miniprepeket, amelyek emésztésekor kiesett a megfelelő hosszúságú inszert. A DNS konstrukciókat DNS szekvenálással ellenőriztettem.

#### **4.8 Fehérje termelés**

Az MKK5 és ERK5 kináz domén (KD) fehérjék expressziójához pETMBP expressziós vektort használtam. Az N-terminális MBP-és C-terminális His6-címkével ellátott fehérjéket az alábbiak szerint expresszáltam. A konstrukciókkal Rosetta pLysS sejteket transzformáltam, és háromszor 50ml, ampicillin és kloramfenikol antibiotikumokat tartalmazó, LB médiumba leoltottam. A starter kultúrát egy éjjel át rázattam 37°C-on. Másnap reggel az adott kultúrából 25 ml-eket osztottam szét 6-szor 1 liter LB médiumba. Ehhez szintén hozzáadtam a megfelelő antibiotikumokat, OD= 0,6-0,7-ig növesztettem a sejteket, majd 0,2 mM IPTG (izopropil-β-

D-tiogalaktozid) hozzáadásával indítottam el az expressziót, ami egy éjjelen át ment 18 °C-on. Mintát vettem az IPTG hozzáadása előtt, és az expresszió végén is a sejtekből, melyeket SDS (Sodium-Dodecyl-Sulphate)-poliakrilamid gélen futtattam meg a megfelelő fehérjetermelés ellenőrzése végett. Az ubikvitinációhoz használt GST-XIAP fehérjét pETARA expressziós vektor segítségével állítottam elő (N-terminális GST és C-terminális His6-címkével), míg az ubikvitin monomer fehérjét pBH4 expressziós vektor segítségével állítottam elő (N-terminális His6-címkével) a fent leírt recept szerint.

#### 4.9 Bakulóvírusos fehérje termelés

Az MKK5 és MEKK3 kinázok inszertjeit módosított pFastBacDual (Invitrogen) vektorba ligáltam (a fent leírt recept szerint), amely N-terminális MBP fúziós fehérjét, illetve C-terminális hisztidin címkét tartalmazott. A kész vektorral transzformáltam *Escherichia coli* DH10 kompetens sejtet, úgy hogy 50 µl kultúrához 2 µg plazmidot adtam, ezt követően fél órát jégben tartottam, majd 45 másodpercre 42°C vízfürdőbe, majd 2 percre ismét jégbe tettem. Utána 450 µl SOC médiumot hozzáadva 3 órán keresztül 37°C-on inkubáltam. Ezt követően kanamicint, tetraciklint, gentamicint, IPTG-t és X-Gal-t (5-bróm-4-klór-3-indolil-beta-D-galaktopiranozid) tartalmazó agarlemezre szélesztettem a sejt kultúrát és egy éjszakára 37°C-on termosztátban inkubáltam. Másnap kék-fehér szelekció segítségével kiválasztottam egy fehér telepet, amit folyadék kultúrába tovább oltottam (a fent felsorolt antibiotikumok mellett) és megint egy éjszakára 37°C-on inkubáltam. Következő nap a kultúrából a bakmidot kitisztítottam, majd PCR-rel ellenőriztem az inszertem bakmidba való átugrását. A vírus készítés első fázisában (P1) 1 millió letapadt Sf9 sejtet transzfektáltam 10 µg bakmiddal 6 µl *Cellfectin* reagenssel (Invitrogen) a gyártó útmutatója szerint. Négy nap 28°C-os inkubálás után a fertőzés jelei megjelentek, és a 2 ml sejtmentes felülúszóból 0,3 ml-t 15 millió letapadt Sf9 sejthez adtam. Majd 3 nap 28°C-os inkubálást követően a sejteket lecentrifugáltam (5', 3000 rpm) és a felülúszót elraktam (P2). A harmadik fázisban (P3) a P2 sejtmentes felülúszójából 50 µl-t adtam 50 ml 1,5-1,7 millió/ml Sf9 sejthez. Három nap 28°C-os inkubálás után a sejteket ismét lecentrifugáltam (5', 3000 rpm) és a felülúszót 4°C-on tároltam.



A fehérje expresszióhoz 1 liter 2-2,5 millió/ml Sf9 sejthez 5 ml P3-t adtam, majd 40-42 óra 28°C-os inkubálást követően a sejteket a 4.10 fejezetben leírtak szerint dolgoztam fel.

#### **4.10 Fehérje tisztítás affinitás kromatográfiával**

A kultúrákból centrifugálással gyűjtöttem össze a sejteket (Beckman Coulter Avanti J-26 XPI, 10', 4000 rpm, 4°C). A centrifugálás után a felülúszót leöntöttem, majd literenként számolva 30 ml lízis pufferrel (50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 20mM imidazol, 0,2% CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), 2mM β-merkaptóetanol (pH=8)) elhomogenizáltam a sejteket. Ezek után a szuszpenziókatt egymást követve kétszer folyékony nitrogénben fagyasztottam, és langyos vízben felengedtem. Az ez után következő szonikálással (Branson SONIFER 250, 2x45 sec.) fejeztem be a lizálást. A lizátumhoz 600 µg-nyi DNázt adtam, majd lecentrifugáltam (Beckman Coulter Avanti J-26 XPI, 30', 20000 rpm, 4°C). A felülúszóhoz hozzáadtam a megfelelő mennyiségű Ni-gyantát (kb. 1ml gyanta per 40 mg várt fehérje), és 30 percig forgatva kevertettem 4°C-on. A fél óra letelte után a gyantát kromatográfiás oszlopba töltöttem, és 3-3 lépcsőben mostam 10 oszloptérfogat mosó I. (50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 40mM imidazol, 2mM β-merkaptóetanol), és mosó II. pufferrel (20mM Tris, 1M NaCl, 20mM imidazol, 2mM β-merkaptóetanol). A mosási lépéseket követően 5 térfogat eluáló pufferrel (20mM Tris, 200mM NaCl, 400mM imidazol, 10% glicerint, 2mM β-merkaptóetanol, 0,2% BOG (Octyl-beta-D-glucopyranoside)) szorítottam le a fehérjét a gyantáról, és koncentrációját Bradford-reagens segítségével 595 nm-es hullámhosszon mértem meg. Ezen kívül SDS-poliakrilamid gélen is megfuttattam a tisztaság ellenőrzése céljából. A Ni-gyantán pucolt fehérjék további tisztítását GST vagy MBP-gyantával végeztem. Az eluátumokhoz megfelelő mennyiségű gyantát adtam ( kb. 1ml gyanta per 5 mg várt fehérje), és 30 percig forgatva kevertettem 4°C-on. A fél óra letelte után a gyantát kromatográfiás oszlopba töltöttem és 10 oszloptérfogat mosó pufferrel (20mM Tris, 200mM NaCl, 1mM EDTA, 2mM β-merkaptóetanol (pH=8)) mostam. A mosást követően 30mM glutationt/maltózt tartalmazó eluáló pufferrel szorítottam le a fehérjét a gyantáról. A fehérjékhez 10% glicerint és 2mM TCEP-et (tris(2-carboxyethyl)phosphine) adtam.

#### 4.11 Ioncsere, töményítés

Az ioncserét megelőzően az Erk5 mintát 20-szoros térfogatú dializáló pufferben (20mM Tris, 50mM NaCl, 10% glicerín, 2mM DTT (Dithiothreitol)), egy éjszakán át, kevertetve dializáltam (dialízis membrán; 12-14kDa). A fluoreszcens polarizációs mérésre szánt fehérjéről az MBP-címkét 20-ad térfogatnyi 1mg/ml-es TEV-proteáz (Tobacco etch virus) oldat hozzáadásával, a dialízis közben hasítottam le.

Az ioncseréhez FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) rendszert használtam. A fehérjéket HighTrap<sup>TM</sup> Q HP anioncserélő oszlopon az alábbi pufferekkel tisztítottam gradiens elúcióval: A puffer (20mM Tris, 50mM NaCl, 10% glicerín, 2mM DTT), B puffer (20mM Tris, 1M NaCl, 10% glicerín, 2mM DTT). A fehérjék 20-25% B pufferben eluálódtak. Az ioncserélt fehérjéket 2mM TCEP hozzáadása után fagyasztottam le folyékony nitrogénben.

#### 4.12 Fluoreszcencia polarizációs mérések

A mérés során arra voltam kíváncsi, hogy a fluoreszcens peptid/fehérje az ERK5-tel milyen mértékben lép interakcióba. A jelölt peptidek/fehérjék síkban polarizált fénynyalábbal megvilágítva olyan fluoreszcens fényt bocsájtanak ki, aminek polarizációs foka attól függ, hogy mekkora a komplex képződés mértéke. A kisméretű fluoreszcensen jelzett peptid/fehérje önmagában olyan gyorsan forog, hogy a fluoreszcens fény polarizáltsága szinte eltűnik. Viszont ha komplexet alkot egy nagyméretű kinázsal, annyira lelassul a forgása, hogy a fény nagymértékben polarizált marad és a jel nő.

A fluoreszcencia polarizációs mérésekhez a jelölt MKK5 konstrukciókat úgy állítottam elő, hogy a fehérje 109-dik pozíciójában található cisztein aminosavhoz konjugáltattam festék molekulát. A jelölés során 5-jódacetoamid-fluoreszceint alkalmaztam (5-IAF), amelyet DMF szerves oldószerben oldottam fel, úgy hogy koncentrációja 20 mM legyen. Ebből adtam 5-szörös moláris feleslegben az előzőleg PBS pufferben (pH=7) dializált fehérjékhez (a festék 8-as pH felett már amino-csoportokhoz is képes kötődni), majd szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltam 2 órán át. Későbbiekben a nem kötődött festéket

PD-10-es sómentesítő oszloppal távolítottam el (a festett fehérje az első 5 ml frakcióban jött le, a kötetlen festék az oszlopon maradt). A festettség arányát spektrofotométerrel határoztam meg, úgy hogy az abszorbancia értékeket a festett fehérjéből származó mintából 280 nm-en, illetve a festék emissziós maximumán, 492 nm-en mértem. A kapott értékek alapján számoltam a fehérje, illetve a festék koncentrációját. A számítások szerint a festettség aránya 70-75%.

A jelölt peptid/fehérje fluoreszcencia polarizációs változását növekvő kináz koncentráció jelenlétében mértem le. 0-tól 50µM-os kináz koncentrációig (100mM NaCl, 20mM Tris, 1mg/ml BSA, 10nM TAMRA vagy CF jelölt peptid/5-IAF jelölt PB1-D fehérje, 2 mM DTT, változó töménységű ERK5 KD kináz koncentráció) 10 pontban felező hígításokat készítettem. Minden egyes mintából 3-szor 20µl-eket mértem ki 384-lyukú plate-re és az FP jelet Analyst GT vagy BioTek Synergy H4 műszeren mértem. TAMRA jelölés esetén 550nm-es gerjesztéssel és 590nm hullámhosszú emissziós tartományban mértem 4:4 Dichroic 561-es szűrőn keresztül. Míg 5-IAF/CF jelölés esetén 490nm-es gerjesztéssel és 520nm hullámhosszú emissziós tartományban mértem 1:1 Dichroic 505-ös szűrőt használva.

A három párhuzamos mérésből kapott adatokat az OriginPro7 programmal értékeltem ki a következő egyenlet segítségével (a görbe illesztés során kapott egyensúlyi állandó mellett fel van tüntetve az illesztésből eredő bizonytalansági tényező is) :

$$FP = FP_{\min} + (FP_{\max} - FP_{\min}) \frac{(T_0 + P_0 + K_d) - \sqrt{(T_0 + P_0 + K_d)^2 - 4T_0 P_0}}{2P_0}$$

FP= mért polarizációs érték; FPmin= minimális polarizációs érték (a jelölt peptid önmagában); FPmax = maximális polarizációs érték (telítés); T0= a kináz koncentrációja; P0= jelölt peptid koncentrációja; Kd= disszociációs állandó.

A jelölt peptidek/fehérjék Kd-jainak ismeretében, a jelöletlen peptidek és a MKK5 fragmentumok affinitását kompetitív titrálással mértem meg, úgy hogy az ERK5 a jelölt molekulával 60-80% kezdeti telítettségben legyen. Szintén 10 pontban, 0-250 µM peptid és 0-25 µM MKK5 fragmentum koncentrációig (100mM NaCl, 20mM Tris, 1mg/ml BSA, 10nM jelölt peptid/5-IAF-jelölt PB1-D, 10µM és 3 µM ERK5 KD, 5 mM DTT, változó töménységű

jelöletlen peptid vagy MKK5 fragmentum koncentráció) felező hígításokat készítettem, majd az előző kísérletekhez hasonlóan detektáltam. Az adatokat ebben az esetben egy kompetitív titrálási modell segítségével értékeltem ki. Egyes esetekben a telítési görbék y-tengelyén nem az előbb említett FP értékeket tüntettem fel, hanem a görbe illesztésből kapott, FP<sub>max</sub> és FP<sub>min</sub> értékekből számolt komplex képződés arányát, úgy hogy a kapott FP értékekből kivontam az FP<sub>min</sub> értéket, majd ezt elosztottam az FP<sub>max</sub> és FP<sub>min</sub> különbségével.

#### 4.13 Pull-down kísérletek

A pull-down egy olyan, molekulák közötti kötődések vizsgálatra alkalmas *in vitro* technika, ahol az ún. csali fehérjék immobilizáltak, míg az ún. préda fehérjék szabadon vannak jelen a rendszerben. A kötődési vizsgálatokhoz elsőként a csalikat (immobilizált fehérje) készítettem el: 0,8 mg MKK5 konstrukciót 1,5 ml-ig hígítottam MBP-kötőpufferrel. Ezek után 120 µl MBP-gyantát adtam hozzá és 30 percig forgatva kevertettem 4°C-on. A fél óra letelte után lecentrifugáltam (Heraeus Pico 17 asztali centrifuga, 2', 2000 rpm), majd a gyantáról leszívtam a felülúszót és 60 µl MBP-kötőpuffert adtam hozzá. A préda elkészítéséhez ERK5 KD-t hígítottam 200 µl-re MBP-kötőpufferrel, úgy hogy végkoncentrációja 10µM legyen. Majd ehhez, a már előzően elkészített csaliból bemértem 60 µl-t és fél órán át szobahőn inkubáltam (10 percenként vortexeltem). Az inkubálást követően centrifugáltam (2', 2000 rpm), a felülúszót leszívtam és 200 µl MBP-kötőpufferrel mostam. Ezt háromszor megismételtem, végül pedig a szárazra szívott gyantához 30 µl SDS minta puffert adtam, és 3 percig 98°C-on forraltam. A kötődés detektálásához SDS-poliakrilamid gélen megfuttattam a mintákat. A lehúzott préda pozícióját tisztított préda (pozitív kontroll) párhuzamos futtatásával, míg az aspecifikus (gyantához való) kötődést csak MBP-vel töltött gyanta (negatív kontroll) segítségével ellenőriztem. A GST-MEKK3 konstrukciókkal végzett kísérleteket is hasonló módon végeztem el, természetesen ebben az esetben a kötődési esszé kontrolljához GST fehérjét használtam.

#### 4.14 *In Vitro* foszforilációs kísérletek

Az *in vitro* foszforilációs kísérletekhez konstitutív aktív MKK5 és kináz inaktív ERK5 fehérjéket állítottam elő. Előbbieket úgy hoztam létre, hogy az aktivációs hurkon a 311-dik pozícióban található szerint és a 315-dik pozícióban álló treonint aszpartátra cseréltem, így helyettesítve az aktív MKK5 fehérjében található foszfoszerint és foszfotreonint. Az ERK5 autofoszforilációját elkerülendő pedig a katalízisben fontos szerepet játszó aszpartátot alaninre cserélve állítottam elő kináz inaktív ERK5 fehérjét, így az képtelen a reakció során magát foszforilálni.

A reakciót úgy mértem össze, hogy 60  $\mu$ l végtérfogatba 12  $\mu$ l kináz puffert (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % glicerin, 0.05 % Igepal, 1 mM DTT pH=7.4), 400  $\mu$ M ATP-t (amely 5  $\mu$ Ci P<sup>32</sup>- $\gamma$ ATP izotópot tartalmazott) tettem. A kísérlet során 1  $\mu$ M MKK5 és 5  $\mu$ M ERK5 koncentrációkkal dolgoztam. A PB1 domén gátlásának feloldását mérő esszében az fentiekhez hasonló MKK5 koncentrációt alkalmaztam, de az ERK5 koncentráció 30  $\mu$ M-ban, míg az MEKK3 és GST fehérjék 10  $\mu$ M-ban voltak jelen a reakcióban

A reakciót az ATP mix hozzáadásával indítottam, majd 25 mM EDTA-t tartalmazó 4 x SDS fehérje felvivő pufferrel állítottam le. Az egy órás reakciók során adott percekben mintákat készítettem úgy, hogy a reakcióelegyből kivettem 5-5  $\mu$ l-t, hozzákevertem Eppendorf-csőbe előre kimért 2,5  $\mu$ l EDTA-s oldathoz, és 98°C-on forraltam 2 percig. Utána minden mintából megfuttattam 2,5  $\mu$ l-t SDS-PAGE-n. A futtatás végén a gélekről levágtam a sófrontot (ebben volt található az el nem reagált P<sup>32</sup>- $\gamma$ ATP). A gél után Coomassie festékkel festettem, festéktelenítettem majd kétszer 20 percig rázattam desztillált vízben. Végül a géleket szűrőpapírra tettem, lefedtem fóliával, és beraktam gélszáritóba kb. 1 órára és 85°C-ra. Ennek letelte után behelyeztem a géleket a gélkazettába (GE Healthcare, Storage Phosphor Screen), és egy éjszakán át hagytam exponálni. Másnap a kazetta fényérzékeny filmjét Typhoon Trio + scanner-be helyeztem, és beolvastam a géleket.

A Western-blot alapú foszforiláció detektálásnál a fent leírtakhoz hasonló kondíciókban vittem véghez a reakciókat (természetes ATP izotóp jelenléte nélkül). A minták SDS-gélen való futtatását követően fél-száraz (semi-dry) alapú blot technikát alkalmaztam, ami előtt a poliakrilamid gél, a nitrocellulóz membránt és az azokat közbe fogó szivacs lapokat SDS blottoló pufferben (20% metanol, 40 mM glicin, 50 mM Tris, 1,5 mM SDS) áztattam 10

percig. Ezt követően a gélről a nitrocellulóz membránra vittem át a mintákat BioRad Trans-Blot SD Transfer Cell készülékkel (15 V, 30-40 perc). A transzfer hatékonyságát Poncaeu festékkel ellenőriztam, majd háromszori TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween) pufferrel való mosást követően, 5% BSA-t tartalmazó TBS-T pufferrel blokkoltam a membránt 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezt követően egész éjszaka 4°C-on inkubáltam az elsődleges ellenanyaggal (1:1000-1:2000 hígításban), majd másnap háromszori mosást követően (TBS-T) 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltam a másodlagos ellenanyaggal (1:5000 hígításban). A jel előhívását ECL reagens segítségével csináltam, a detektálás vagy Typhoon Trio + scanner segítségével történt, vagy fényérzékeny filmen lett előhívva. A Western-blotok során a következő antitesteket használtam: foszfo-ERK5 (pThr218/pTyr220; Cell Signaling, Kat. szám: 3371 ), foszfo-MKK5 (pSer311/pThr315; Santa Cruz Biotechnology, Kat. szám: sc-135702 ), foszfo-JNK1 (pThr183/pTyr185; Cell Signaling, Kat. Szám: 9251S ), foszfo-MKK7 (pSer271/pThr275; Cell Signaling, Kat. Szám: 4171S ), MBP (New England Biolabs, E8038S), HRP-konjugált anti-nyúl (New England Biolabs, 7074S).

#### **4.15 *In Vitro* ubikvitinációs kísérletek**

Az *in vitro* ubikvitináció során a két affinitás-kromatográfiával tisztított MBP-MEKK3, illetve a cégtől vásárolt GST-MEKK2 kinázok (SignalChem, Kat. Szám: M10-10G) 0,2 µM-ban volt jelen a reakcióban, 0,1 µM E1, 0,1 µM E2, 0,2 µM GST-XIAP, 25 µM ubikvitin jelenlétében. A reakciót 0,5 µM ATP segítségével indítottam el és 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. A 30 perc lejárta után adtam hozzá a 0,5 µM MAP2K-t, 5 µM MAPK-t, illetve további 0,5 µM ATP-vel hozzáadásával indítottam el a foszforilációt, és a már fent említett módon, Western-blottal vizsgáltam a reakció végeredményét. Az E1 és E2 enzimek a Boston Biochem cégtől származnak (Katalógus Szám; E1: E-300, E2: E2-603).

#### **4.16. Gélfiltrálás és Kristályosítás**

A kristályosításhoz és röntgendiffrakciós szerkezet meghatározáshoz az ERK5 kináz domén és MKK5 PB1-D konstrukciókat a kettős affinitás-kromatográfiát követően egy

éjszaka folyamán 4°C-on dializáltam (150 mM NaCl, 20 mM Tris). Ezután Superdex 75 (GE Healthcare) gélfiltráló oszlopon tisztítva, a PB1-D-t feleslegben használva a komplex méretének megfelelő frakciókat 10 mg/ml töménységűre koncentrálni kezdtem, majd a kristályosító körülmények tesztelésére. A komplex képződés ellenőrzéséhez első körben feleslegben használt IAF jelölt PB1-D konstrukcióval kevertem össze az ERK5-t, és az IAF festéket spektrális tulajdonságának megfelelően 492 nm-en követtem a komplex képződést. A kromatogramon látható, hogy az ERK5 jelenlétében a (kék) csúcs eltolódik a csak PB1-D-IAF-t tartalmazó (piros) csúcshoz képest (**1. melléklet**).

A tesztelés során a fehérje mintához 2 mM  $MgCl_2$  és 2 mM adenilil-imidodifoszfát (AMP-PNP) volt adva, és különböző PEG (polietilén-glikol) körülmények mellett ülőcseppes módszerrel kerestem a megfelelő kristályosító körülményt 23°C-on. Végül a komplex (ERK5 KD + PB1-D) 48% PEG200 és 100 mM MIB (malonát, imidazol, bórsav) pufferben (pH: 6,5), míg az ERK5 fehérje önmagában (apoERK5) 35% PEG1000 és 100 mM Na-citrát puffer (pH: 5,0) mellett kristályosodott. A kristályok folyékony nitrogénben lettek lefagyasztva.

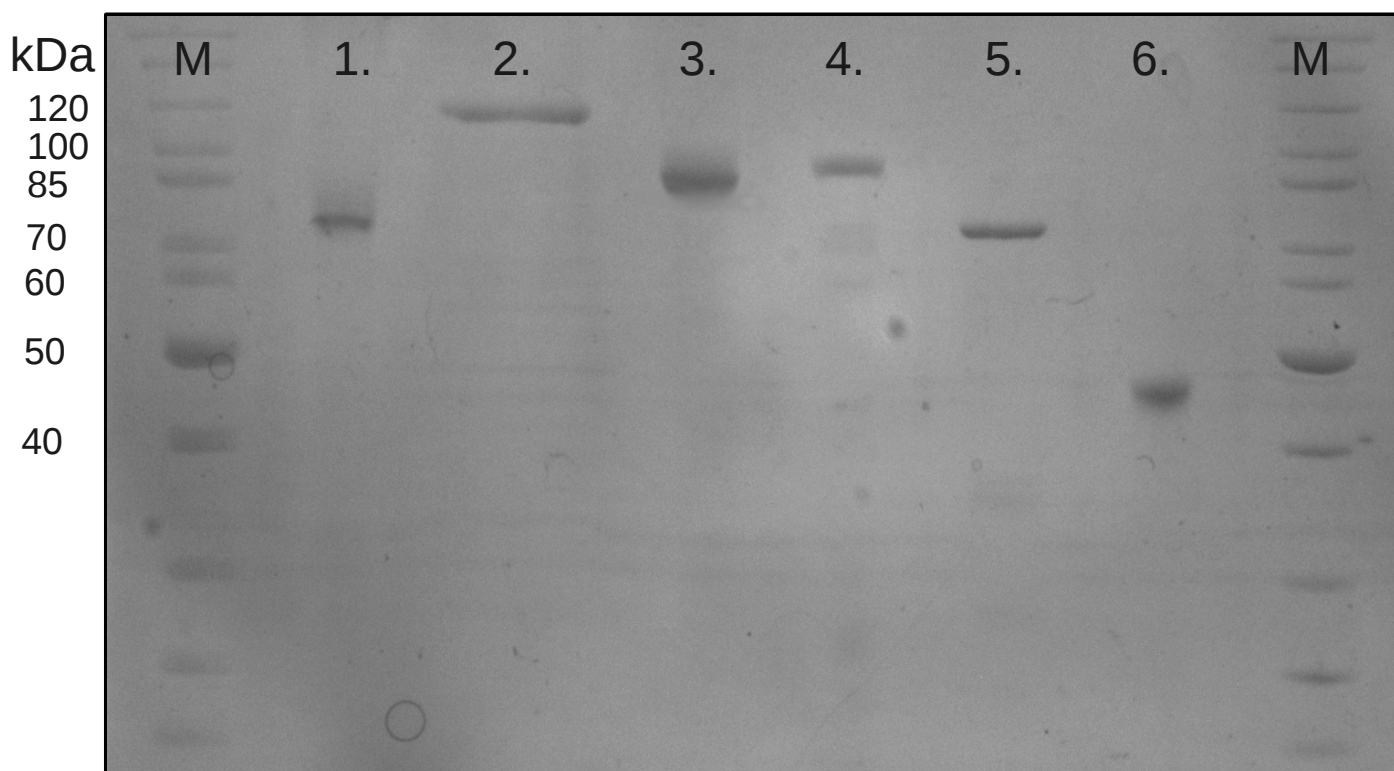
A kristályokról való adatgyűjtést és szerkezetmegoldást Gógl Gergő kollégám végezte, ezért ez nem része a dolgozatnak, a részletek megtalálhatóak a dolgozatom alapjául szolgáló Journal of Biological Chemistry cikkben. Az apoERK5 és az ERK5-PB1-D komplex szerkezetmeghatározása röviden: Az adatgyűjtés a Swiss Light Source (Zürich, Svájc) PXI szinkrotron sugárforráson történt előzetesen folyékony nitrogénben fagyasztott kristályokon. Az apoERK5 kristályszerkezet megoldása a molekuláris helyettesítés módszerével történt, ahol az ERK2 korábban meghatározott kristályszerkezetet használtuk keresőmodellnek (PDB kód: 2Y9Q) (50). Az ERK5-PB1-D komplex szerkezetének megoldása szintén molekuláris helyettesítéssel történt. Itt két keresőmodellt is használtunk. Az egyik a korábban megoldott apoERK5 szerkezet volt, míg a másik a már korábban publikált PB1 heterodimerekből (MEKK2-MKK5) származó MKK5 PB1 domén volt (PDB kód: 2O2V).

## 5. Eredmények

### 5.1 Rekombináns fehérjék előállítása

A munkám során fontos volt, hogy a különböző kölcsönhatási és foszforilációs esszékhez (a kristályosítást is beleértve) jó minőségű, tiszta fehérje preparátumot tudjak előállítani. Többkörös optimalizálást követően a már fent leírt protokollok szerint állítottam elő a különböző fehérjéket. A foszforilációs esszékhez megfelelő enzimaktivitást a bakteriális rendszerből nyert kinázok nem mutattak, ezért a későbbiekben ezeket a fehérjéket bakulovírus rendszerrel termeltem. Döntően a két affinitás-kromatográfiás tisztítás után elég tiszta fehérje preparátumot kaptam az egyes mérésekhez (**10. ábra**).

Mivel az ERK5 egy multidomén fehérje, munkám során az ERK5 kináz doménjével (1-347 aminosav) dolgoztam.



**10. Ábra)** Az SDS poliakrimamid gélen jól látható a különböző esszékhez és kísérletekhez használt fontosabb rekombináns fehérjék tisztasága (>~95%). Az egyes fehérjék a következők: 1. GST-XIAP, 2. MBP-MEKK3, 3. MBP-MKK5, 4. MBP-ERK5, 5. GST-MKK7, 6. JNK1, M – Fehérje létra (Marker).



## 5.2 MKK5-ERK5 interakció feltérképezése

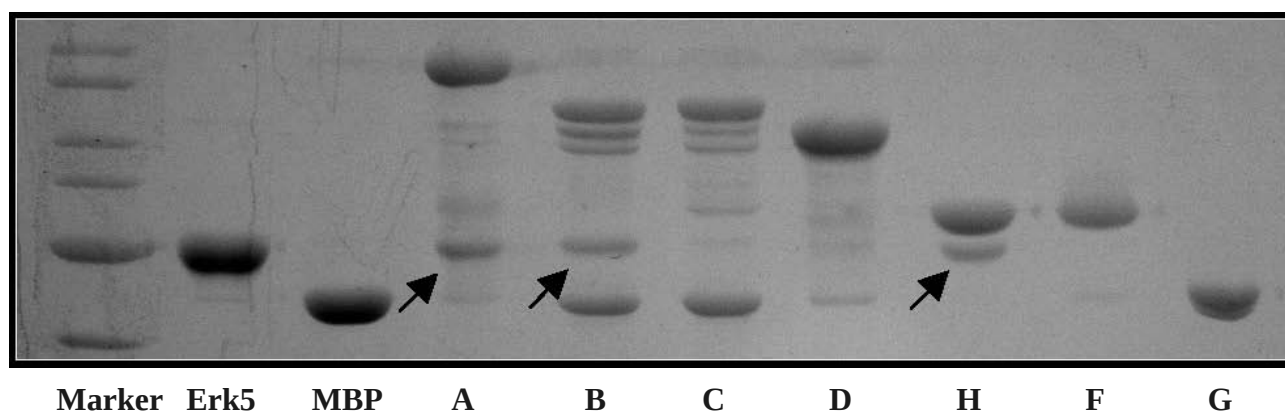
Az irodalom alapján nem volt pontosan ismert, hogy mely MKK5 régiók felelősek az ERK5-tel való kölcsönhatásért. Seyfried és munkatársai nem megfelelő helyen képzeltek el az MKK5-ön található dokkoló motívumot(73). Ők azt feltételezték, hogy a 145-156 aminosavak között található, míg Nakamura és mtsai. a ma már részletesebben ismert konszenzus szekvenciának megfelelően a 117-131 aminosavak közé teszik a D-motívumot, de pontosabb információt ők sem adnak az interakcióban való szerepéről(64).

Az MKK5-ERK5 kötődésben részt vevő MAP2K régiók pontosabb jellemzéséhez először több, különböző MKK5 konstrukciókat hoztam létre, amelyekkel az adott részek fontosságát kívántam feltérképezni (11.ábra).



**11. Ábra)** Az ábrán a pull-down esszéhez használt különböző MKK5 konstrukciók sematikus ábrázolása, illetve a rekombináns fehérje hossza látható. A jelölésben a szürke régió a PB1 domént, a fekete a dokkoló motívumot, míg a rácsos a kináz domént jelenti. A későbbiekben a H konstrukció kap kiemelt figyelmet, amire PB1-D néven fogok hivatkozni.

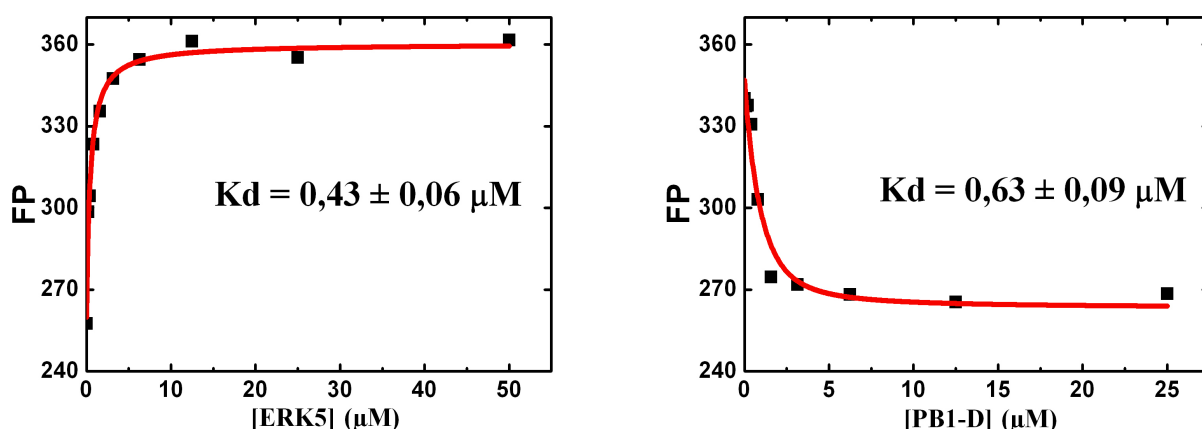
Az elsődleges kötődési vizsgálathoz pull-down esszét alkalmaztam, ahol az egyes MKK5 fragmenseket MBP fúziós fehérjével állítottam elő és ezen keresztül immobilizáltam gyantához. A többször megismételt kísérlet során (N=3) azt az eredményt kaptam, hogy a teljes hosszúságú konstrukció mellett csak a B (PB1 domén + D-motívum) illetve az E és H (D-motívum + kináz domén) konstrukciók mutattak detektálható kötődést ERK5 KD fehérjével. Tehát elmondható, hogy minimum két kölcsönható régió szükséges a feltételezett háromból (PB1 domén, dokkoló motívum, aktívhely). Az előzetes kísérletekből kiindulva a H konstrukció már egy, a kristályosításhoz szánt MKK5 fragmens, amellyel szintén elvégeztem a pull-down esszét (12. ábra).



**12. Ábra)** A pull-down esszé eredménye. Az SDS poliakrilamid gélen látható a különböző MKK5 konstrukciók ERK5 kötő képessége. A gél alapján a teljes hosszúságú, ill. a B és H fehérjék kötődtek a partner kinázzal. A kötődést a képen a fekete nyílak mutatják.

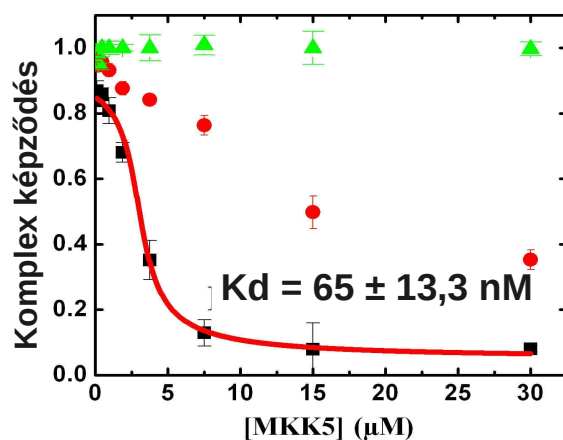
A kvalitatív eredményeket követően kvantitatív módszerrel is megkívántam mérni az egyes régiók kötődési paramétereit. Ehhez fluoreszcencia polarizációs (FP) esszét alkalmaztam, amely során jelölt MKK5 konstrukciókkal mértem. A mérési rendszer

helyességét különböző kompetitív titrálások mérésével bizonyítottam, amelyek azt mutatták, hogy az egyes molekula jelölések nem zavarják a kísérletet. Az első körben a pull-down esszé alapján érdekesnek vélt H konstrukciót (PB1-D) jelöltem 5-jódacetamid-fluoreszceinnel, az abban található egyetlen cisztein aminosavon keresztül. A direkt és kompetitív mérések is azt mutatták, hogy a PB1-D egy relatíve erős, fél mikromólos kötődési állandójú ( $K_d \sim 0,5 \mu\text{M}$ ) interakciót hoz létre az ERK5 kináz doménjével (**13. ábra**).



**13. Ábra)** A fluoreszcencia polarizációs mérés eredménye. A bal oldali panel a jelölt PB1-D-vel végzett direkt titrálások eredményt mutatja, míg a jobb oldalon a kompetitív titrálások mérés látható. A y-tengelyen látható mértékegység mesterséges polarizációs egység. Mérésszám:  $N=3$

Az első FP mérést követően a PB1-D-IAF konstrukciót riporter rendszerként felhasználva csináltam egy sor kompetitív titrálások mérést, amit a pull-down kísérletből ismert különböző hosszúságú MKK5 fehérjékkel végeztem. Ez a mérés jól mutatta, hogy a teljes hosszúságú MKK5 nagy affinitással köti az ERK5 KD-t, míg a PB1 domént nem tartalmazó konstrukció alig, a csak kináz domént tartalmazó fragmens pedig egyáltalán nem szorította le a PB1-D-IAF-ot (**14.ábra**). Ez utóbbi mérés jól mutatja, hogy a kináz domén a PB1-D-hez képest más felszínt használ az ERK5 KD-en. Ezen mérések megerősítik azt az elképzelést, miszerint mindhárom kölcsönható elem részt vesz az MKK5-ERK5 interakcióban.

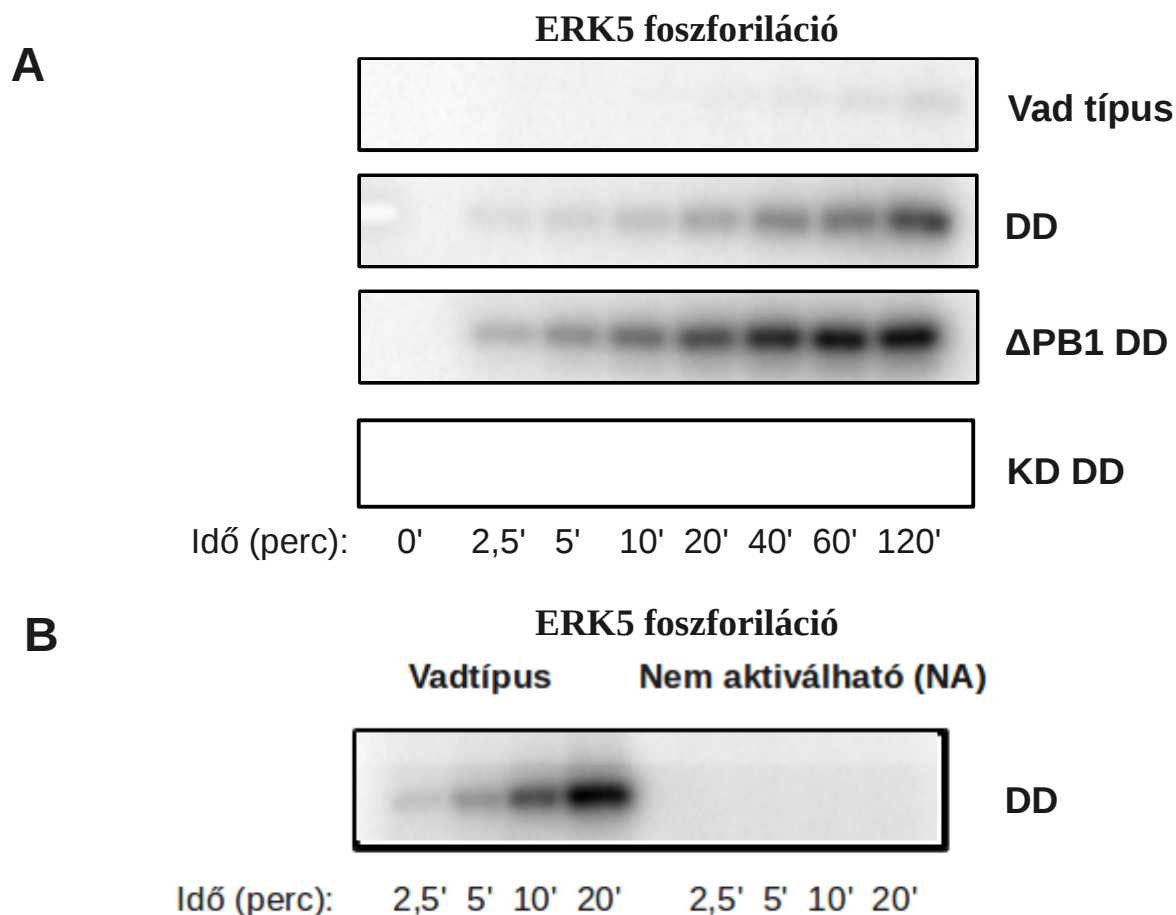


**14. Ábra)** A különböző hosszúságú MKK5 fehérjékkel végzett kompetitív titrálósos FP mérés eredménye. Fekete pontok a teljes hosszúságú, a piros a  $\Delta PB1$ , míg a zöld a csak kináz domént tartalmazó konstrukciók eredményeit mutatja. A y-tengelyen látható mértékegység a komplex képződés arányát mutatja. Mérésszám:  $N=3$

A kötődési interakciók mellett foszforilációs esszékkal is bizonyítani akartam az egyes MKK5 régiók interakcióban betöltött fontosságát. Ehhez első körben bakteriális rendszerből származó MKK5 enzimeket használtam, viszont a kezdeti próbálkozásoknál azt tapasztaltam, hogy az E.coli-ből tisztított fehérje nem volt aktív. Ennek következményeként a további mérésekhez rovarsejtből (Sf9) származó enzimekkel dolgoztam, amelyek már megfelelő aktivitást mutattak. Egy másik technikai problémába is ütköztem, ugyanis az esszé során kiderült, hogy az ERK5 képes kis mértékben foszforilálni magát, ezért a későbbiekben ún. kináz-inaktív (KI) ERK5-öt használtam a háttér elkerülése végett.

Az újonnan előállított fehérjékkel elvégzett foszforilációs kísérlet eredménye szerint a vad típusú, teljes hosszúságú fehérje nem volt képes aktiválni az ERK5-öt, míg a három állandóan (konstitutívan) aktív enzimek közül (MKK5 DD, MKK5  $\Delta PB1$  DD, MKK5 KD DD, ahol a DD a 311. szerin, illetve a 315. treonin aminosavak aszparaginsavra való cseréjét mutatja) a csak kináz domént tartalmazó fehérje nem, de a másik két konstrukció foszforilálta a szubsztrátot (**15.A ábra**). Az ERK5-ön létre jövő foszforilálás helyének teszteléséhez a foszforilációs hurkon megtalálható treonin és tirozin aminosavak alaninra való kicserélésével

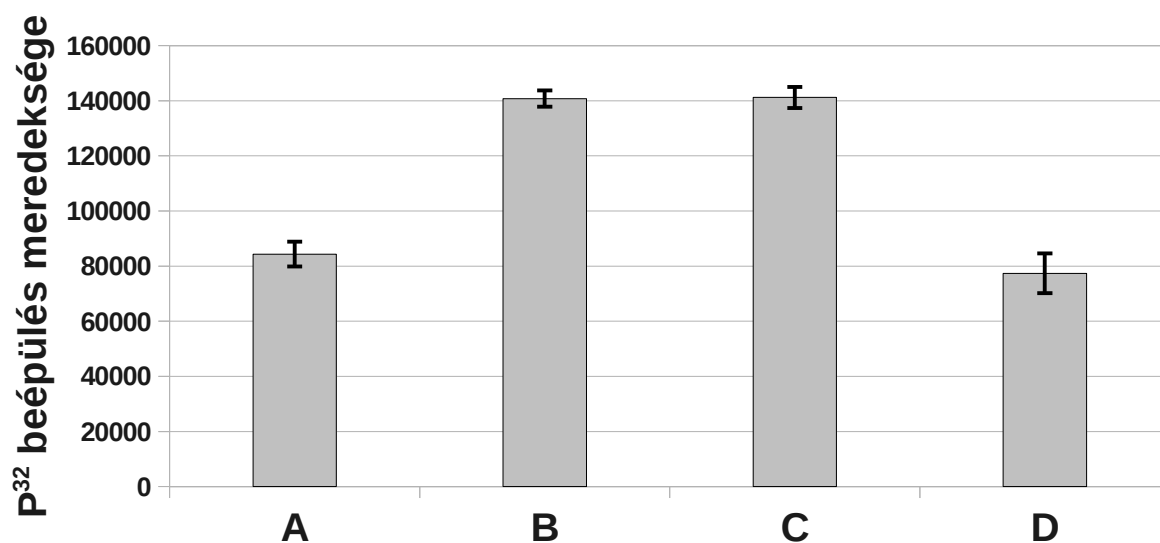
létre hozott nem akitválható ERK5 (ERK5NA) fehérjét hoztam létre, amely a későbbiekben biztosított arról, hogy az MKK5 a megfelelő helyre végzi a foszfo-transzfert (**15.B ábra**).



**15. Ábra)** Az MKK5-ERK5 foszforilációs esszé eredménye. Az A ábrán a radioaktív  $\gamma$ -foszfát csoport beépülése az ERK5-be jól mutatja az egyes MKK5 enzimek aktivitását. A vad típusú fehérje a nem felaktivált teljes hosszúságú MKK5, a DD a teljes hosszúságú konstitutívan aktív, a  $\Delta$ PB1 DD az állandóan aktív csonkolt, míg a KD DD a csak kináz domént tartalmazó állandóan aktív MAP2K-t jelöli. A B ábrán látható, hogy az MKK5 DD által a vadtípusú ERK5 foszforilálódik, míg a 219. treonin és a 221. tirozin aminosavakat alainra cserélve, a nem aktiválható ERK5-be (NA) nem épül be foszfát-csoport.

Érdekes megfigyelés volt, hogy a csonkolt, PB1 domént nem tartalmazó konstrukció jobban aktiválta az ERK5-öt, ami a PB1 domén intramolekuláris gátló szerepére utal. Ennek a

gátlásnak a feloldását a felső aktivátor, a MEKK2/3 PB1 doménje végezheti, hiszen az irodalomból ismert, hogy a PB1-PB1 interakció nélkül nincs MKK5 aktiváció. Ezért egy további foszforilációs kísérletben MEKK3 PB1 domént adtam a mérés során a teljes hosszúságú MKK5-höz, és azt tapasztaltam, hogy a MAP3K PB1 domén jelenlétében valóban kissé megnőtt a fehérje aktivitása az ERK5, mint szubsztrát iránt (**16.ábra**).



**16. Ábra)** Az MKK5 PB1 domén intramolekuláris gátlásának megszüntése hatással van az enzim aktivitásra a MEKK3 PB1 domén által. A mérés során a kináz inaktív ERK5-be épülő radioaktív  $\gamma$ -foszfát csoportot követtem nyomon. A diagrammon látható jelölések a következők: **A** teljes hosszúságú MKK5 DD, **B**  $\Delta$ PB1 MKK5 DD, **C** teljes hosszúságú MKK5 DD és GST-MEKK3 PB1 domén, **D** teljes hosszúságú MKK5 DD és GST kontroll. Mérésszám: N=3.

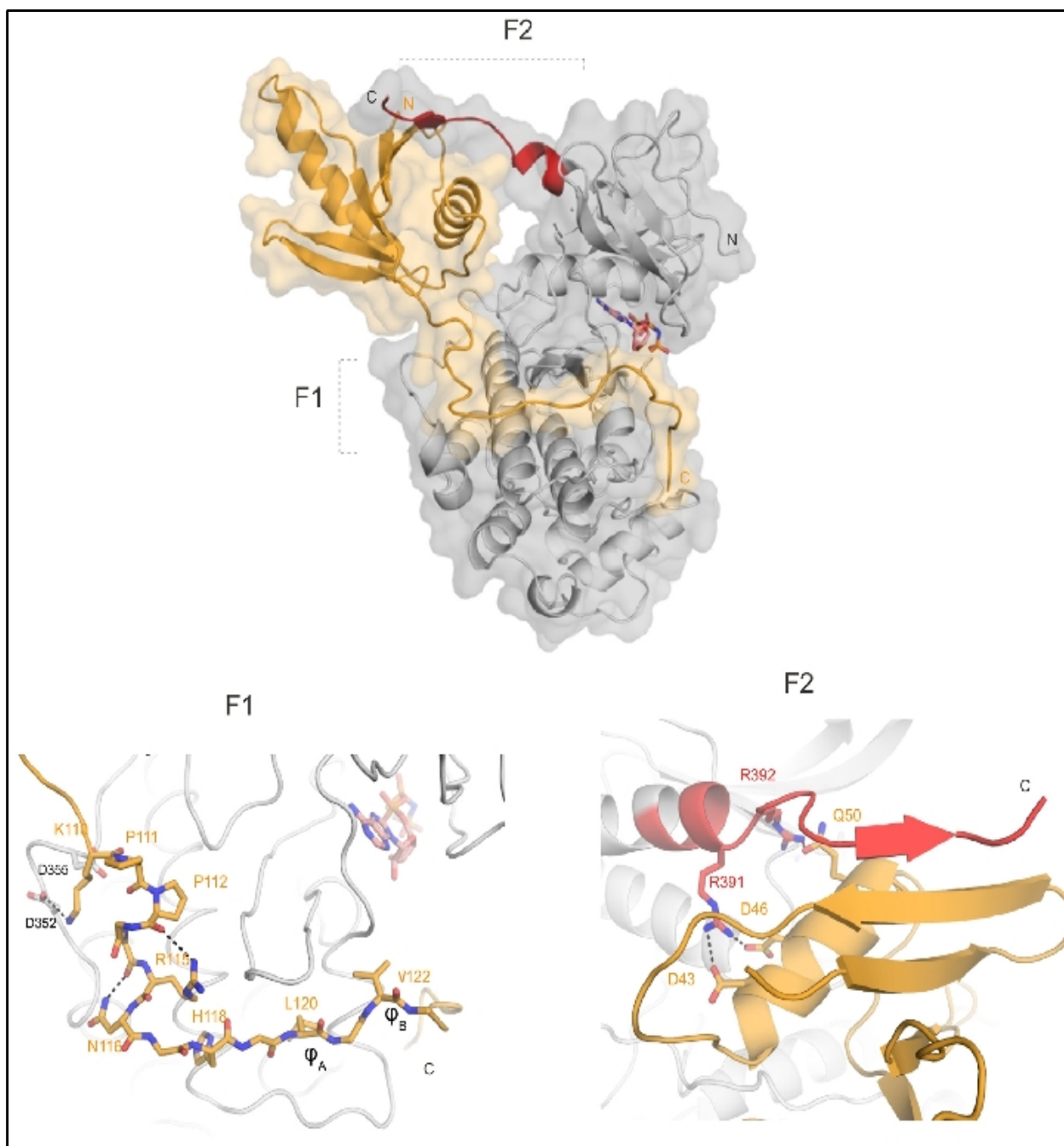
### 5.3 Az MKK5-ERK5 komplex és apoERK5 szerkezetek meghatározása

A kötődési esszéket követően érdekelt az MKK5-ERK5 interakció pontosabb, atomi szintű feltérképezése is, ezért a technikai korlátokat figyelembe véve a PB1-D és ERK5 komplexet kristályosítottam, valamint az ERK5 kináz domént önmagában. Az adatgyűjtés és szerkezet meghatározást követően az adatok azt mutatták, hogy a PB1-D kontrukció két kiemelt felszínen kötődik az ERK5 kináz doménjéhez. Az első a klasszikus, MAP2K-MAPK interakciókra jellemző dokkoló kölcsönhatás (Felszín1, F1). A második felszín pedig egy  $\beta$ -lemez által kialakuló kölcsönható felszín a PB1 domén és az ERK5 kináz doménjének C-terminális extenzió között (Felszín2, F2). Az extenzió név eredete, hogy szekvencia összehasonlításból az látható, hogy az ERK5 ezen a szakaszon különbözik főképp az ERK2-höz képest (**2. melléklet**).

A dokkoló interakció atomi részletei kissé meglepőek az eddig irodalomban leírtak alapján várt kölcsönhatástól, ugyanis a vártakhoz képest nem az MKK5 Arg115, hanem Lys110 kötődik az ERK5 kináz domén CD-árkában található negatív töltésű aminosavakhoz, azon belül is az Asp352-höz. A Lys110 és a hidrofób régió között a motívum szerkezetét egy intramolekuláris H-hídon keresztül az Arg115 és Asn116 stabilizálja egy rövid II-es típusú poliprolin hélix segítségével (Pro111 és Pro112). Emellett a kináz domén hidrofób  $\phi$ -X- $\phi$  árkaiba, klasszikus módon, a D-motívum két hidrofób aminosava (Leu 120 és Val122) fekszik. A másik kölcsönható felszínen a PB1 domén jó pár aminosavja által képzett főlánc (26-32) alakít ki hidrogén-hidakat az ERK5 kináz doménjének C-terminális extenziójával, amely még két arginin (Arg391 és Arg392) segítségével stabilizálja az interakciót (**17.ábra**).

A kapott szerkezet ellenőrzéséhez szintén FP alapú módszert választottam. Ehhez több olyan mutáns fehérjét állítottam elő, amik olyan felszínen voltak megváltoztatva, amely a szerkezet szerint kiemelten fontosak. A teszthez elsőként egy C-terminális extenziót nem tartalmazó ERK5 (ERK5 $\Delta$ C385-399), és egy dokkoló szekvenciában mutáns PB1-D konstrukciót (R115A, L120A, V122A) állítottam elő, amelyek közül utóbbit a vad típushoz hasonlóan IAF festékkel jelöltem (PB1-Dmut). A különböző vad típusú és mutáns fehérjéket kombinatorikusan összeállítva végeztem el az FP méréseket. Az eredmények jól mutatják, hogy a fent már bemutatott vad típusú fehérjék közötti kölcsönhatáshoz képest magasabb

disszociációs értékeket kaptam, tehát a kötődés gyengült a fontos aminosavak megváltoztatásával. A vad típusú ERK5-höz a PB1-Dmut közel 60-szoros ( $K_d \sim 28 \mu\text{M}$ ), az ERK5 $\Delta\text{C}$ -hez a vad típusú PB1-D kb. 20-szoros ( $K_d \sim 9 \mu\text{M}$ ) affinitás veszteséget szenvedett el, míg a két mutáns fehérje között nem volt kimutatható kötődés (1. táblázat)(3A. melléklet).





**17. Ábra)** A képen az MKK5 PB1-D (narancs) és ERK5 (szürke) komplex szerkezete látható. A két kináz közötti kölcsönhatást két régió biztosítja, az egyik a klasszikus dokkoló interakcióért felelős D-motívum és árok (F1), illetve a PB1 domén és az ERK5 C-terminális extenziója (piros) között létrejövő (F2) kötődési felszín. A szerkezetben az AMP-PNP rózsaszín pálcikával, illetve az egyes kialakuló hidrogén hidak fekete szaggatott vonallal vannak jelölve.

Név	ERK5	ERK5ΔC
<b>PB1-D</b>	0,5 μM	9,4 μM
<b>PB1-Dmut</b>	27,5 μM	-

**1. táblázat)** A táblázatban a kapott kristályszerkezet teszteléséhez használt különböző ERK5 és MKK5 fehérjékkel végzett FP mérések eredménye látható. A táblázatban az egyes fehérjék között mért disszociációs állandó ( $K_d$ ) van feltüntetve.

#### 5.4 Az ERK2 és ERK5 fehérjék közötti szubsztrát specificitás szerkezeti tényezői

Először a már bemutatott PB1-D-IAF és különböző irodalomból ismert ERK2 partner molekulákból származó, dokkoló motívumokat tartalmazó jelölt peptidekkel végeztem FP méréseket a két kinázra. Összehasonlításképp míg az ERK5 felé a PB1-D molekula erős kötődést biztosít, addig az ERK2-höz nem mutatott kölcsönhatást. Ugyanez igaz az MKK5-ERK5 komplex szerkezet által megtervezett MKK5 dokkoló motívumot tartalmazó peptid, a pepMKK5-re is. A különböző peptidek között megtalálható mind a két kináz által aktivált szubsztrát, a MEF2A transzkripció faktorból származó dokkoló régió is. Kezdetben a TAMRA (karboxiltetrametilrodamin) jelölt pepMEF2A-val végeztem az első vizsgálatokat,

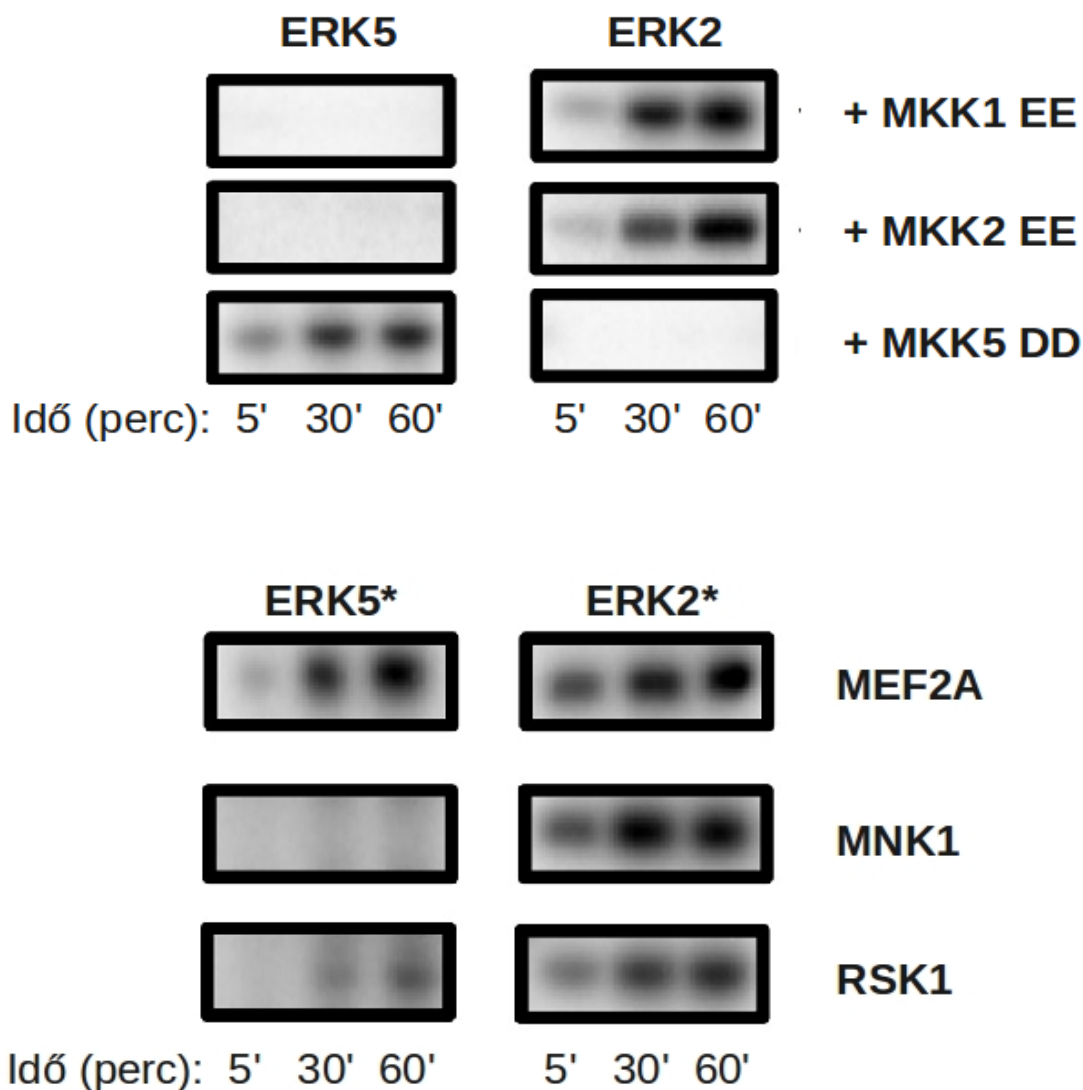
ami azt mutatta, hogy a két kinázhoz közel hasonló mértékben kötődik (**3B.melléklet**). A következőkben már jól karakterizált ERK2 szubsztrátok egyes D-motívumaival végeztem kompetitív titrálós FP kísérleteket, ahol a fent említett karboxifluoroszcein jelölt pepMKK5-öt használtam riporter molekulaként. A peptidek között megtalálható két, ismert ERK2 szubsztrát MAPKAPK fehérje, az RSK1 és az MNK1 kinázokból, valamint egy szintén ismert ERK2 kináz foszfatázból, a HePTP-ből származó D-motívumok. A mérések alapján elmondható, hogy az egyes peptidek közül csupán az RSK1 peptid mutatott kötődést az ERK5 felé, bár gyengét ( $K_d \sim 26 \mu\text{M}$ )(**2. Táblázat**)(**3C.melléklet**).

Név	Szekvencia	ERK5	ERK2
PB1-D		0,5 $\mu\text{M}$	-
pepMKK5	ASKPPGERNIHGLKVTRA	4,2 $\mu\text{M}$	-
pepMEF2A	SRKPDLRVVIPPS	5,9 $\mu\text{M}$	8,9 $\mu\text{M}$
pepMKK1*	MPKKKPTPIQLNP	-	18,7 $\mu\text{M}$
pepMKK2*	RRRPVLPALTINP	-	7,7 $\mu\text{M}$
pepHePTP*	RLPERRGSNVALMLDV	-	6,3 $\mu\text{M}$
pepMNK1*	MKLSPPSKSRLARRRALA	-	0,7 $\mu\text{M}$
pepRSK1*	PQLKPIESSILAQRVRKLPSTTL	26,2 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$

**2. Táblázat)** A táblázat a két MAP kinázzal mért kompetitív titrálós FP mérés eredményeit mutatja, ahol jelölt MKK5 peptidet használtam riporter rendszernek (pepMKK5-CF) A szekvenciákon belül a kövérített betűkkel a dokkoló interakcióban fontos aminosavak vannak feltüntetve. A csillaggal (\*) jelölt peptidek és ERK2 közötti méréseket Garai Ágnes kolléganőm végezte el (50). A táblázatban az egyes fehérjék között mért disszociációs állandó ( $K_d$ ) van feltüntetve.

Az FP méréseket több foszforilációs esszéből kapott eredmény is megerősítette, ahol a különböző MAPK-okat konstitutívan aktív MAPK2K-kal aktiváltam. A kináz esszé eredményei is jó egyezést mutatnak a kötődési esszék eredményeivel. Az ERK2-t kizárólag az MKK1 és 2, míg az ERK5-t csak az MKK5 aktiválta (**18. ábra**), viszont Nakamuráék tanulmányuk alatt bemutattak egy olyan hibrid MAPK2K-t, amely MKK1 kináz domént, de MKK5 PB1 domént is tartalmazott. Ez a kevert konstrukció képes volt foszforilálni az ERK5-t(63). A további foszforilációs eredmények is azt mutatták, hogy a felaktivált MAPK-ok a

teljes hosszúságú partner fehérjéket is az FP mérésnél láttak alapján diszkriminálják. Az ERK2 mind a három szubsztrátot képes volt foszforilálni, míg az ERK5 a MEF2A-t az ERK2-höz hasonló erősséggel, míg az RSK1-t igen gyengén volt képes aktiválni (18. ábra).

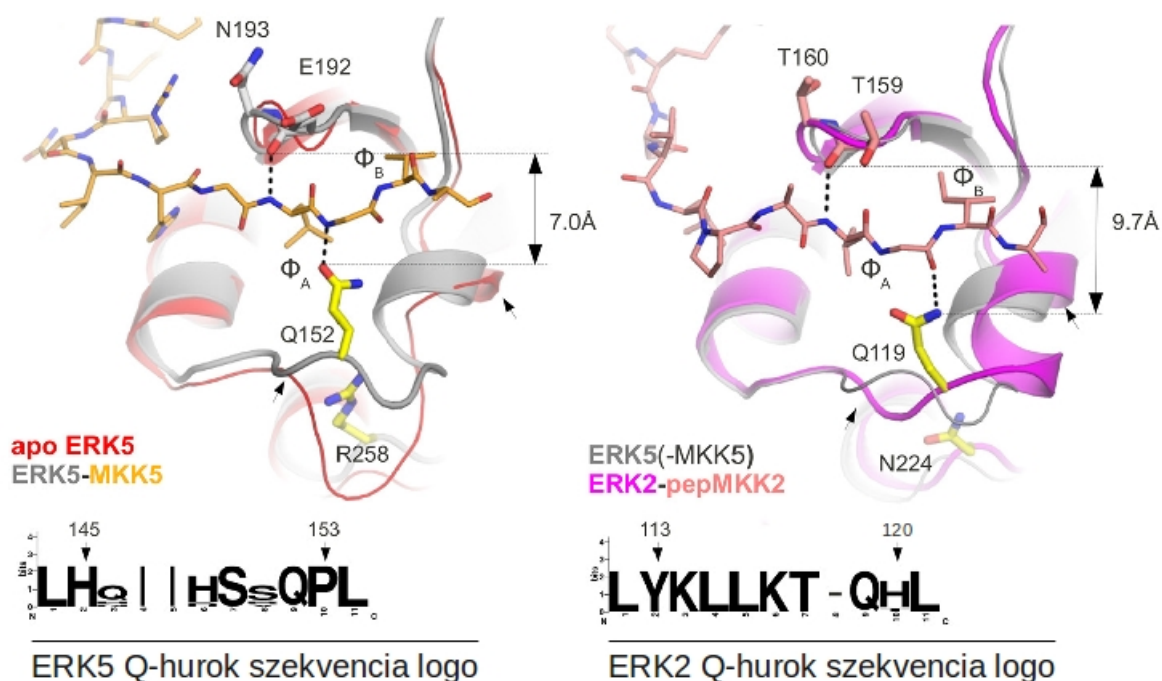


**18. Ábra)** Az ábrán a különböző foszforilációs mérések eredményei láthatóak. A felső ábrán látható az egyes konstitutívan aktív MAP2K foszforilációs képessége a különböző MAPK-on. Az állandóan aktív MAP2K a foszforilációs hurkukon a szerint és treonin aminosavak helyét glutamátot (E) vagy aszpartátot (D) tartalmazzák. Az alsó ábrán a konstitutívan aktív MAP2K által felaktivált MAP

*kinázok (ERK\*) foszforilációs képessége látható a különböző szubsztrátokon. A három időpontban vett mintán a radioaktív  $\gamma$ -foszfát csoport beépülését láthatjuk.*

A két MAP kináz közötti szubsztrát specificitás szerkezeti értelmezéséhez először látnunk kell a két katalitikus domén szekvencia hasonlóságát (**2. melléklet**). Az ERK2 és ERK5 szekvencia szinten kb. 80%-ban megegyeznek, a melléklet alapján látható, hogy egyik fő különbség az ERK5 C-terminális extenziójának megléte, amely a PB1 domén kötésében közvetlenül részt vesz. További különbségek a szekvenciában szétszórtn fordulnak elő, de szerkezeti szinten ezek a módosulások mind a dokkoló árok környéki régiókban találhatóak meg.

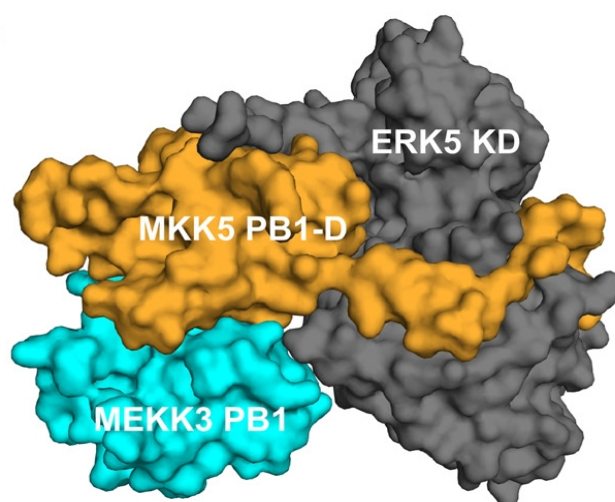
A megoldott apoERK5 és PB1-D-ERK5 komplex részletesebb tanulmányozása során megfigyeltem több szerkezetbeli különbséget a  $\phi$ -X- $\phi$  árok körül. Az árok alapját képező szakasz (ERK5 145-153 aminosav) az apoERK5 szerkezetben kevésbé rendezett struktúrát mutat, de a PB1-D bekötődésének hatására nagy mértékű változáson esik át. Ez a mechanizmus az irodalomból jól ismert apoERK2 és különböző ERK2 komplex szerkezeteknél nem tapasztalható. Az ezen a szakaszon található konzervált glutamin (ERK2-ben Gln119, ERK5-ben Gln152) fontos szerepet játszik a D-motívumokkal való kapcsolattartásban, úgy hogy annak amino-csoportja H-hidat képez a motívum  $\phi$ A és  $\phi$ B között található aminosavval. Ezt a régiót a glutamin kitüntetett szerepe miatt Q-huroknak hívjuk. A Q-hurok és az árok “tetejét” képező ún. specificitási hurok közötti távolság a két kináz esetén jelentős különbséget mutat, mivel az ERK5-ben található Glu192 és Asn193 nagyobb helyet foglal el, mint az ERK2-ben ugyanitt található két treonin (T159 és T160). Továbbá az ERK5 Q-loop a másik kinázéhoz képest egy aminosavnyi inszerciót tartalmaz, amely tovább csökkenti az árok szélességét, úgy hogy előbbi hurkot alulról egy arginin (Arg258) jobban az árok felé tolja, mint az ERK2-ben található, hasonló tartó funkciót betöltő aszparagin (Asn224) (**19. ábra**).



**19. Ábra** Az ábrán a két MAPK dokkoló árkának hidrofób régiója látható. A bal oldalon az ERK5 kináz doménjének nem kötött (piros) és kötött (szürke) állapotainak topológiai különbsége figyelhető meg az MKK5 dokkoló motívum (narancs) bekötődésének hatására. A jobb oldalon PB1-D ERK5 komplexszel (szürke) összehasonlítva látható az ERK2 (bíbor) és MKK2 dokkoló peptid (rózsaszín) komplex. A két dokkoló árok szélességét a két konzervált, hidrogén hidakat kialakító aminosavak közötti távolság mutatja, míg a Q-hurkokon (két nyíl által határolt szakasz) a glutaminok és a hurkot tartó aminosavak sárga pálcikával vannak jelölve. A szerkezet alatt látható szekvencia lógók a Q-hurkok evolúciós konzerváltságát mutatja.

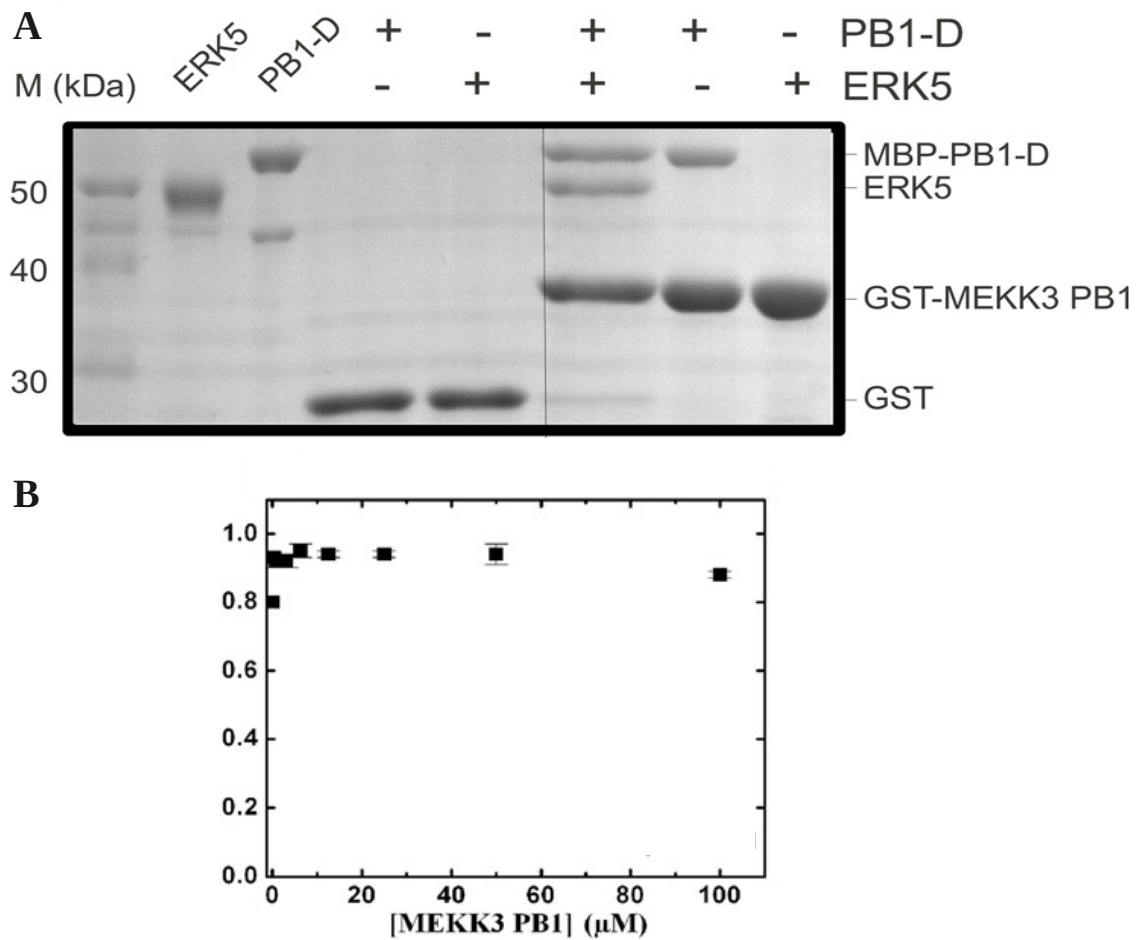
## 5.5 Az MKK5 PB1 domén állványozó szerepe

Az ERK5 jelpálya három elemének (MEKK2/3, MKK5, ERK5) együttes összeállítását már Nakamura és munkatársai is feltételezték(63). Az MKK5-ERK5 komplex és egy korábban már az irodalomból ismert MEKK3 PB1-MKK5 PB1 domén komplex (PDB kód: 2O2V) egymásra illesztésénél jól látható, hogy az MKK5 PB1 doménen keresztüli összeszerelődésnek nincs sztérikus gátja, illetve hogy a felső aktivátor (MEKK3) és a szubsztrát (ERK5) a doménen más felszínt használ a kölcsönhatáshoz (20. ábra).



**20. Ábra)** Az ERK5 jelpálya elemeinek összeszerelődése. A két kristály szerkezet alapján összeillesztett modellen látható, hogy a MEKK3 PB1 domén (cián), a MKK5 PB1 domén (narancs), illetve az ERK5 kináz domén (szürke) egy harmadlagos komplexsége állhat össze.

A feltételezés ellenőrzéséhez pull-down és FP alapú kötődési esszéket alkalmaztam. A kontrollok mellett a pull-down kísérlet jól mutatja, hogy a gyöngyre kötött GST-MEKK3 PB1 domén mind az MBP-MKK5 PB1 domént, mind az ERK5-t köti (az előbbin keresztül). A későbbiekben az eredményeket FP méréssel is alátámasztottam, úgy hogy jelölt PB1-D és ERK5 kináz doménhez GST-MEKK3 PB1 domént növekvő koncentrációban titráltam. A kapott FP jelek jól mutatják, hogy összeáll a harmadlagos komplex. A növekvő MEKK3 PB1 koncentráció hatására nem csökken a jel, tehát nincs kompetíció, sőt az apró jel növekedés a riporter rendszeren belüli molekulaméret növekedésre utal (21.ábra).

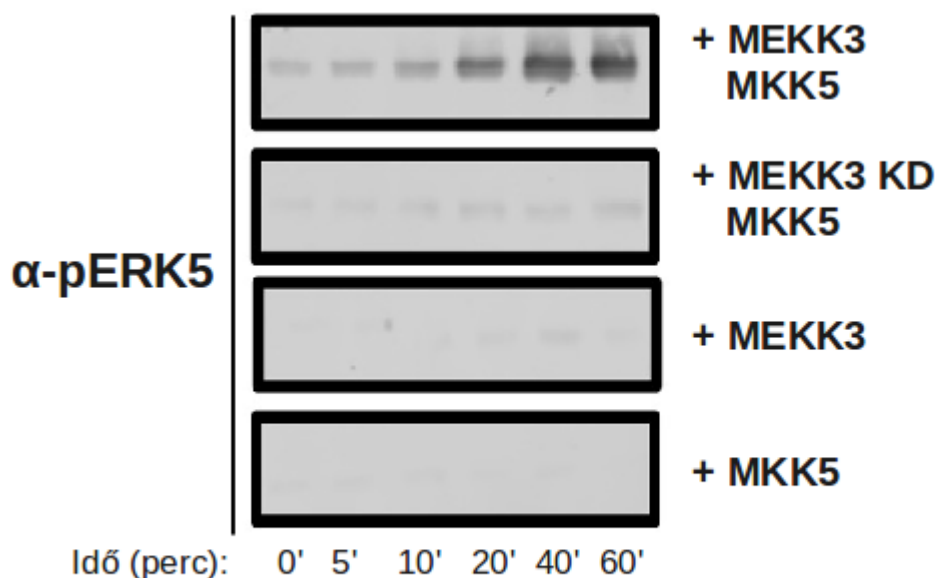


**21. Ábra)** Az MKK5 PB1 domén állványozó szerepének tesztelése. Az **A** ábrán látható pull-down esszé jól mutatja, hogy immobilizált GST-MEKK3 PB1 domén az MKK5 PB1 doménon keresztül köti az ERK5 kináz domént, míg a kontrollnál használt GST fehérjénél nincs detektálható kötődés. A **B** ábra mutatja, hogy az IAF jelölt PB1-D konstrukció és ERK5 riporter rendszer által adott jel a MEKK3 PB1 domén hatására növekszik, nincs kompetíció. A y-tengelyen látható mértékegység a komplex képződés arányát mutatja. Mérészám: N=3

## 5.6 Az ERK5 jelpálya ubikvitin-függő szabályozása

Az alábbi téma a Frankfurti Goethe Orvosi Egyetem egyik kutatócsoportjának kezdeményezésére indult el. A frankfurti kollégák egy korábbi tanulmányuk során azt vették észre, hogy a XIAP E3 ubikvitin ligáz deficiens HeLa sejtvonalakon az ERK5 foszforiláltsági szintje megnövekedett, tehát a XIAP valamilyen szinten negatívan szabályozhatja a jelpályát. Az eredményeik igazolásához az *in vitro* kísérletek lebonyolítását én végeztem.

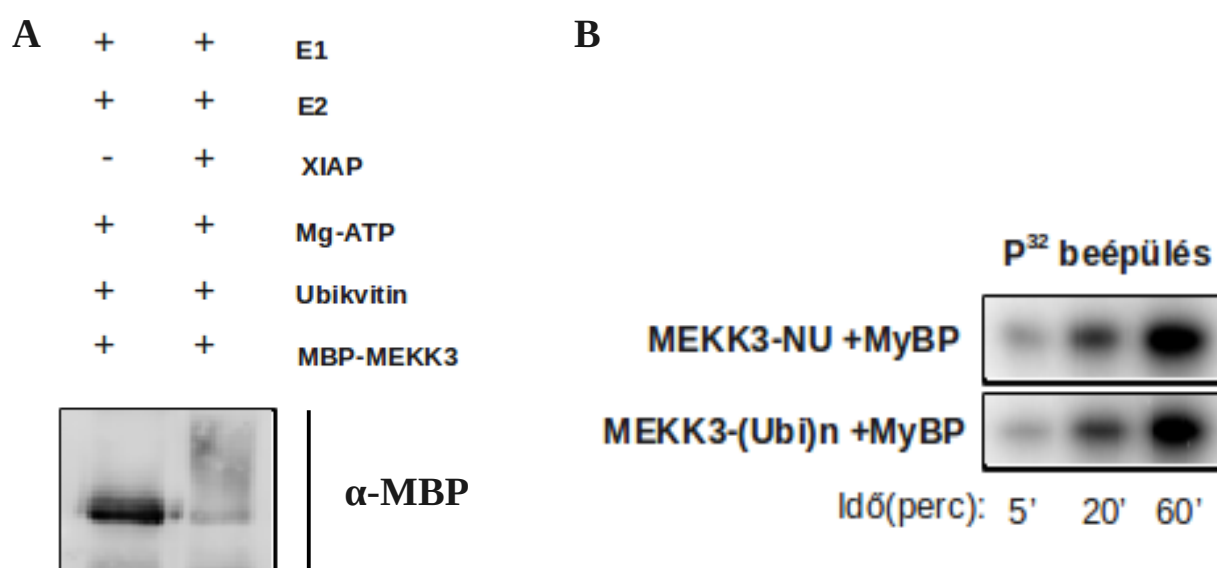
Az első körben egy olyan foszforilációs esszét állítottam be, amely során a jel a MAP3K-tól indulva, a MAP2K-n keresztül a MAP kinázig jut el. Ehhez kezdetben a korábbiakhoz hasonlóan P<sup>32</sup> alapú kináz esszét választottam, de a korai eredmények azt mutatták, hogy a MEKK3 közvetlenül is képes foszforilálni az ERK5-t, igaz nem annak foszforilációs hurkán. Ezért a későbbiekben az egyes elemek foszforiláltságának állapotát anti-foszfo elleanyagok segítségével, Western-blot alapú technikával detektáltam. A kísérleti eredmények azt mutatták, ami egyébként a korábbi információk szerint várható volt, hogy az ERK5 foszforiláltság csak akkor volt észlelhető, mikor a teljes hosszúságú MEKK3 volt jelen a reakcióban. Amikor csak kináz domént tartalmazó konstrukció (MEKK3 KD), illetve kizárólag vagy vad típusú MKK5 enzim vagy teljes hosszúságú MEKK3 volt jelen, akkor nem volt ERK5 aktiváció (22. ábra).





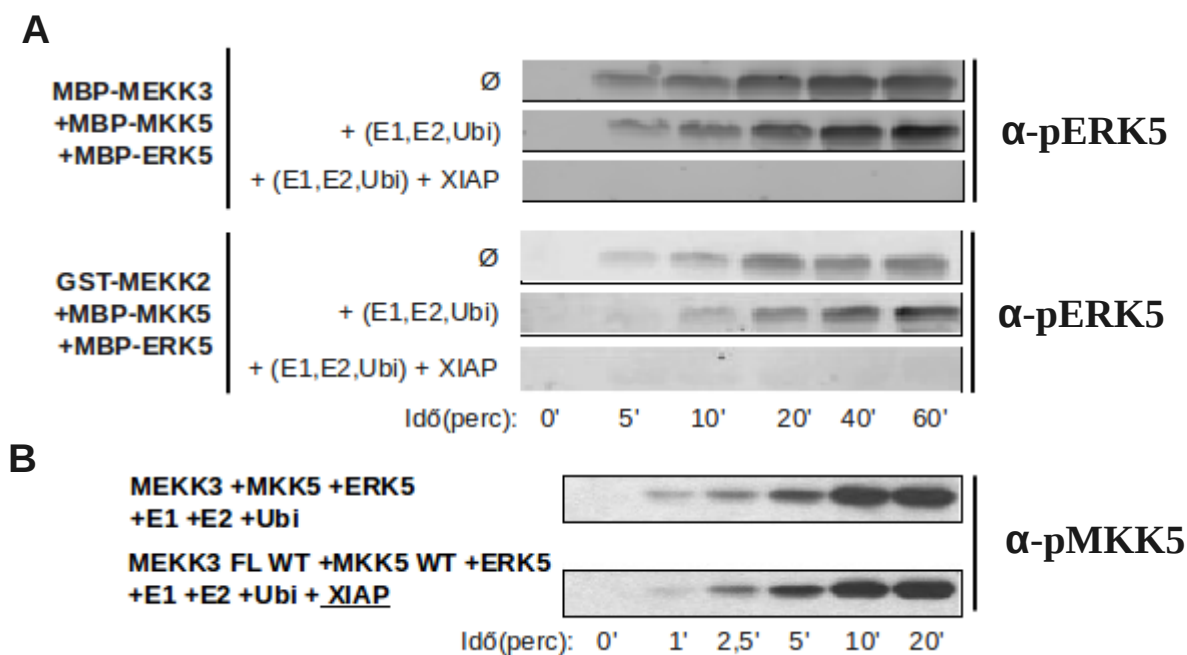
**22.Ábra)** Az ERK5 jelpálya három elemét tartalmazó foszforilációs esszé. A mérés során vad típusú teljes hosszúságú vagy csonkolt (KD) MEKK3, vad típusú MKK5 és kináz inaktív ERK5-t használtam. A foszforiláció detektálásához foszfo-ERK5 (pThr218/pTyr220) antitestet használtam.

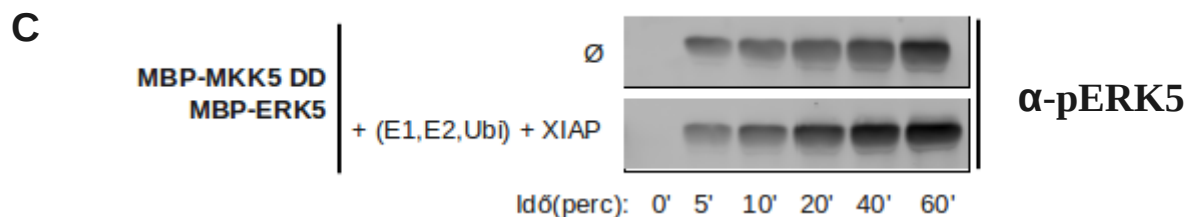
A következő kísérletek során arról akartam megbizonyosodni, hogy milyen *in vitro* körülmények mellett képes a XIAP enzim a MEKK3 fehérjét ubikvitinálni. Mivel az *in vitro* ubikvitinálás hasonló körülmények között is lejátszódik, mint amit a különböző foszforilációs esszéknél alkalmaztam, a két *in vitro* folyamatot időben egymásután el tudtam végezni. Az első körben megbizonyosodtam, hogy az ubikvitinálás végbe megy a MAP3 kinázokon. Az ubikvitináció eredményeképpen látható, hogy az MBP-MEKK3 molekulamérete megnövekszik, ha mindhárom ubikvitinálásért felelős enzim (E1, E2, XIAP) jelen van a reakcióban. A XIAP enzim kihagyásával azonban nem történik eltolódás (**23A.ábra**). A későbbiekben arra kerestem választ, hogy a korábban tapasztalt ERK5 foszforilációs szint változás milyen mechanizmus eredménye. Kérdés volt, hogy az ubikvitináció hatására esetlegesen lecsökken a MAP3 kinázok aktivitása, vagy a MEKK3-MKK5-ERK5 harmadlagos komplexen belül az ERK5 beépülés sérül. Az első lépésben azt vizsgáltam, hogyan változik a MEKK3 aktivitása ubikvitináció hatására. Ehhez az általános kináz szubsztráton, a mielin bázikus fehérjén (MyBP) való foszforilációs mintázat változását követtem nyomon. Az eredmények azt mutatták, hogy a ubikvitináció hatására a MEKK3 aktivitása nem változott (**23B.ábra**).



**23.ábra)** A MEKK3 ubikvitinációja és annak következménye a kináz aktivitására. Az **A** ábrán látható, hogy a teljes ubikvitinációért felelős enzim készlet (E1, E2, XIAP, ubikvitin) jelenléte mellett a MEKK3 molekulamérete a ráhelyezett ubikvitinláncok miatt megnövekszik. Az MBP-MEKK3 eltolódását anti-MBP antitesttel detektáltam. Az **B** ábrán látható, hogy a radioaktív  $\gamma$ -foszfát csoport beépülésének mértéke nem változik a mielin bázikus fehérjén (MyBP) a MEKK3 ubikvitinációjának hatására.

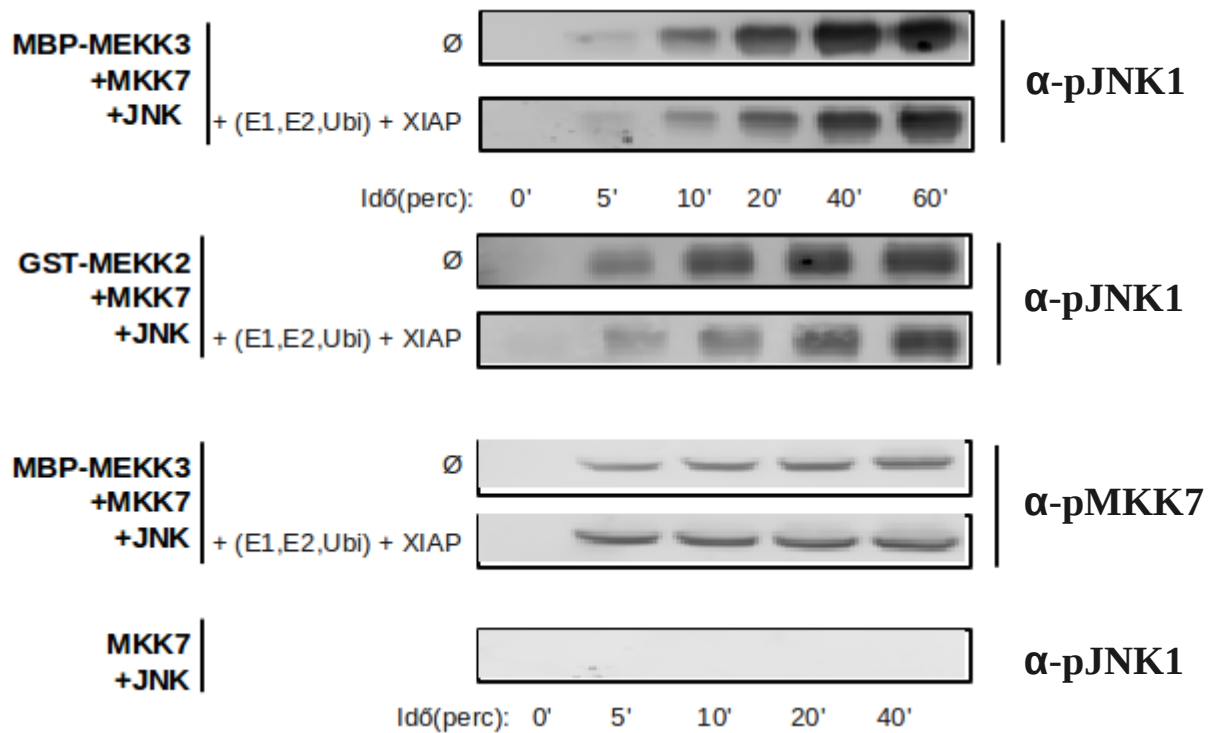
Miután látható, hogy az ubikvitináció hatására nem változik a MEKK3 aktivitása, ezért olyan kísérleteket végeztem, ahol kináz inaktív ERK5 foszforilációs szint különbségeit vizsgálom. Ehhez először is a MEKK3 ubikvitinációja szükséges, majd azt követően az MKK5 és ERK5 fehérjék hozzáadásával már a korábban kidolgozott foszforilációs esszét felhasználva vizsgáltam ezt a kérdést. Az eredmények szerint a XIAP általi ubikvitináció hatására az MKK5 foszforilációs szintje egyáltalán nem, míg az ERK5 foszforilációs szintje drasztikusan csökkent (**24A és 24B.ábra**). Ezt a kísérletet nem csak MBP-MEKK3, de GST-MEKK2-n is elvégeztem, és hasonló eredményeket kaptam. Kísérleteimmel azt is vizsgáltam, hogy lehetséges-e, hogy az MKK5 is ubikvitinálódik és ezáltal változik az ERK5 aktivációs szintje. Az eredményeim azonban azt mutatják, hogy a MAP2K nem áll ilyen szabályozás alatt (**24C.ábra**).





**24. ábra)** Az *in vitro* ubikvitinációs kísérletek Western-blot eredményei. Az **A** ábrán látható, hogy az ERK5 foszofriláció véghez megy, ha a rendszer nem tartalmaz XIAP ligázt, tehát az jelpálya XIAP-függő szabályozás alatt áll. A **B** és **C** ábra mutatja, hogy az ubikvitináció nem befolyásolja az MKK5 foszforilációs szintjét, illetve közvetlenül annak aktivitását. A **C** ábrán látható méréshez állandóan aktív MKK5 konstrukciót használtam. A foszforiláció detektálásához foszfo-ERK5 (pThr218/pTyr220), illetve foszfo-MKK5 (pSer311/pThr315) antitestet használtam.

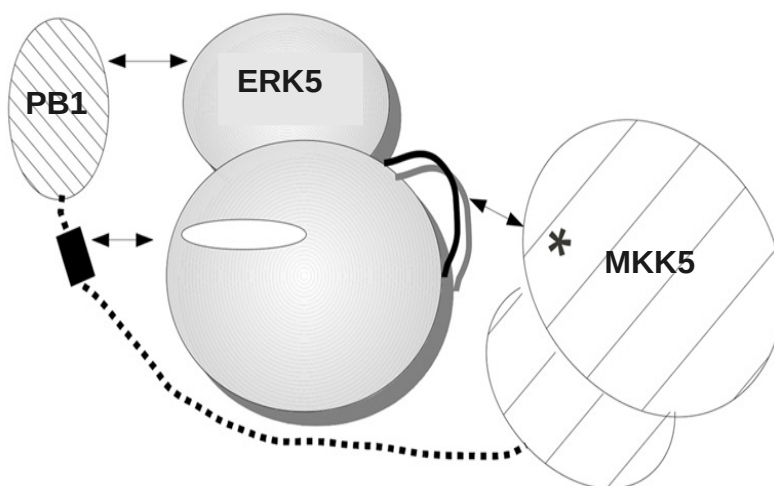
A későbbiekben arra is kíváncsi voltam, hogy ez a szabályozásai mechanizmus más jelpálya esetén is előfordul-e, vagy csak az ERK5 útvonalra specifikus. Ezért ugyanezeket a kísérleteket a JNK útvonalon is elvégeztem, mivel ennek a pályának szintén felső aktivátora a MEKK2 és 3. Érdekességgént a kísérletekből az látszik, hogy a JNK1 aktiváció nem szenved csökkenést a MEKK3-n megjelenő ubikvitinlánc miatt, tehát ez az útvonal nem áll egy XIAP-függő szabályozás alatt (**25.ábra**).



**25. Ábra)** Az *in vitro* ubikvitinációs kísérletek Western-blot eredményei. Az ábrákon látható, hogy sem az MBP-MEKK3, sem az GST-MEKK2 ubikvitinációja nem befolyásolja a JNK útvonalban a jelterjedést, mivel mind az MKK7, mind a JNK1 foszforilációs szintje változatlan. Az utolsó panel ellenőrzésképpen mutatja, hogy a felső aktivátorok nélkül (MEKK2/3) nem volt JNK aktiváció. A foszforiláció detektálásához foszfo-JNK1 (pThr183/pTyr185), illetve foszfo-MKK7 (pSer271/pThr275) antitestet használtam.

## 6. Az eredmények megvitatása

Összefoglalva a munkám során kapott eredményeket megállapítható, hogy az MKK5-ERK5 kölcsönhatás során azok a szerkezeti régiók játszanak főbb szerepet, amelyek az ERK2/ERK5 összehasonlításban ERK5 specifikusnak mondhatóak. Az egyes kölcsönhatási esszék (pull-down és FP mérések) jól mutatják, hogy a MAP2K-ok között unikális MKK5 PB1 domén, és hasonlóan a MAPK-ok között egyedi ERK5 C-terminális extenzió fontos a specifikus interakcióban. Ezzel az egyedi kölcsönható felszínnel, továbbá a MAPK modulokra jellemző, konzervált dokkoló interakción, illetve a két kináz doménen (MKK5 aktívhely és ERK5 foszforilációs hurkon) keresztül specifikus kötődés alakulhat ki aktivátor és szubsztrátja között (26.ábra).



**26. Ábra)** Az ERK5-MKK5 interakció sematikus ábrázolása. A három MKK5 régió, a PB1 domén, a dokkoló motívum (fekete téglalap), illetve a kináz aktívhelye (csillaggal jelölve) felelős az ERK5-tel való specifikus kölcsönhatásért.

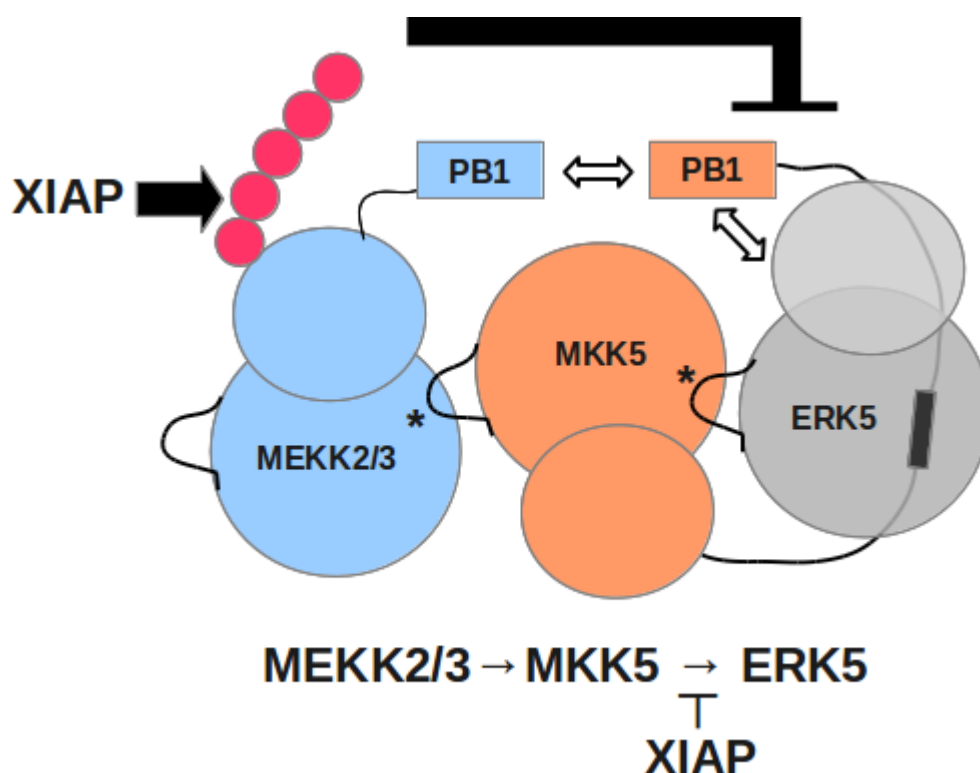
A paralóg enzimekből álló jelátviteli kaszkádok egyik fontos kérdése, hogy milyen szerkezeti tulajdonságok biztosítják a megfelelő jelterjedést. Az eredmények azt mutatják, hogy a MAPK modulok közül kiragadott két jelpálya, az ERK2 és ERK5 fehérjék között apró szerkezeti sajátosságok döntőek ebben a finom szabályozásban. Mivel ezen útvonalak elemei sem szöveti megjelenési különbséggel, sem sejten belüli lokalizációs különbséggel nem

bírnak, ezért a jelterjedés megfelelő huzalozását a szabályzó vagy katalitikus domének topológiai különbségében kell keresni.

A kináz domének szerkezeti tanulmányozása és az azt alátámasztó kötődési esszék jól mutatják, hogy a fent említett egyedi felületek és a dokkoló árok környékén található aminosav összetétel különbség már képes elérni azt a finom szabályozást, hogy az ERK2 és ERK5 aktivációja és aktivitása specifikus legyen. A két katalitikus doménen található dokkoló árok szélesség különbség képes diszkriminálni az oda bekötődő dokkoló motívumokat. Kollégáim korábbi tanulmányukban már bemutatták, hogy az ERK2/JNK/p38 klasszikus MAP kinázok között ezek a lineáris motívumok a kaszkádokon belül található elemek kötődés-specifitásának fő befolyásolói(50). Egy másik tanulmány azt az érdekes megfigyelést mutatja be, hogy az egyes lineáris, rendezetlen fehérje régiókban, mint például a dokkoló motívumokat tartalmazó szakaszokban az evolúció során gyakrabban fordulnak elő változások (mutációk), így könnyebben alakulhatnak ki új jelátviteli kapcsolatok(103). Ezekből az adatokból már könnyen értelmezhető, hogy a két kináz domén fiziológiai különbségét könnyen biztosíthatja az, hogy a dokkoló áruk minimális megváltozása könnyen ér el pozitív vagy negatív diszkriminációt az egyes partner molekulák D-motívuma felé. Egy másik általános tulajdonság is segíti a szabályozást, még pedig, hogy a jelátviteli fehérjék többsége moduláris felépítésű, sokszor a katalitikus domén mellett tartalmaznak egy sor szabályzó globuláris domént is. Ezek a domének gén duplikációk és más genomi változások során variálódhatnak az egyes géneken belül. Talán ez lehetett a kulcsa a MEKK2/3-MKK5 kapcsolat kialakulásának is, amelyhez végső soron az ERK5 is adaptálódott annak C-terminális extenziójának felhasználásával, és így kialakulhatott egy alapjaiban új jelátviteli fehérje komplex. Továbbá érdemes megjegyezni, hogy az ERK5 a kináz doménjétől C-terminálisan található közel 400 aminosav hosszú, NLS-t tartalmazó, ko-transzkripció szakaszával képes közvetlenül a sejtmagba jutni, ellentétben az ERK2-vel(70).

Ennek a sajátos harmadlagos komplexnek a megléte a továbbiakban biztosította azt, hogy egy másik elterjedt poszttranszlációs módosítás képes legyen befolyásolni a MAPK aktivációját (ERK5), úgy hogy közben egy másik jelpálya érintetlen marad (JNK). Az ubikvitinációs mérések egyértelműen bizonyítják, hogy az ERK5 egy XIAP-függő szabályozás alatt áll. A frankfurti kollégák munkája azt is megmutatja (ezek az eredmények a dolgozatban nincsenek bemutatva), hogy ez a reguláció nem a proteoszóma felé hajtja a

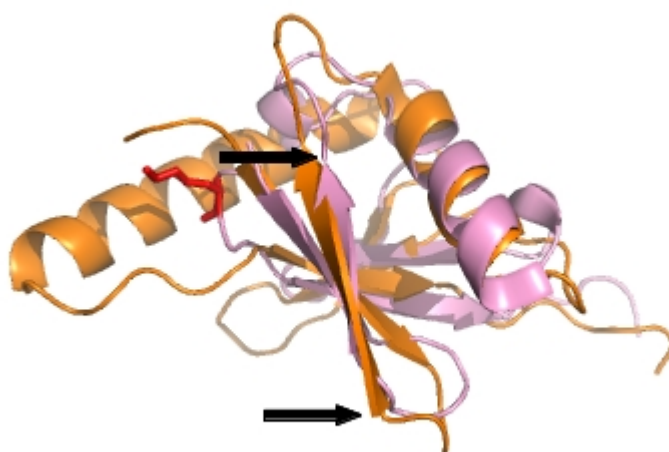
MEKK2/3-t, hanem a 63-as lizinen keresztül kialakuló poliubikvitin láncokra jellemző nem-proteolitikus szabályozáson keresztül zajlik (27.ábra).



**27. Ábra)** Az ERK5 jelpálya interakciós és szabályozási mechanizmusának sematikus ábrázolása. Az MKK5 PB1 doméneken keresztül összeálló elemek (fehér nyilak) a kaskád irányának megfelelően aktiválják egymást (csillaggal jelölve). De a XIAP által megjelenő poliubikvitin-lánc megjelenésével (rózsaszín) az ERK5 foszforilációja sérül.

A munkám során azonban még nem sikerült azt a pontos, atomi szintű részleteket megfigyelni, hogy az ERK5 inaktiváció milyen pontos mechanizmust követ. Technikai korlátok miatt nem jártam sikerrel abban, hogy a két hipotézis közül kizárjak egyet, miszerint az ubikvitináció hatására az ERK5 komplexbe való beépülése, vagy a komplexen belül az MKK5 általi aktivációja sérül-e. Érdekes megfigyelés azonban, hogy mind a PB1 domén,

mind az ubikvitin monomer szerkezete hasonló, ún. ubikvitin feltekeredést (fold-ot) mutat (28.ábra). Ennek a hasonló szerkezeti felépítésnek az is lehet a következménye, hogy a MEKK2/3-on megjelenő számos ubikvitin molekula egyike, egyfajta mimikriével, a komplexben tartja az ERK5-t, de mivel az nem az MKK5 PB1 doménjével alakított ki kapcsolatot, így a MAPK nem jut aktivációs közelségbe az MKK5-höz. Lényegében az ubikvitin lánc a harmadlagos komplexen belüli MKK5-ERK5 kölcsönhatás kialakulásával közvetlenül interferálhat. Valamint ennek a szabályozásnak a feltérképezésével feltártam egy olyan mechanizmust, amellyel a közös felső aktivátorral rendelkező jelpályák között átkapcsolás jöhet létre. Mivel az ERK5 és JNK útvonalak más-más fiziológias feladatot látnak el, ezért döntő tényező, hogy az MEKK2/3 aktiváció differenciációt vagy esetlegesen apoptotikus folyamatokat indít el. Egy ilyen “váltó” szabályozás az embrionális fejlődés során fontos tényező lehet a helyes szövet- vagy szervfejlődés során.



**28. Ábra)** Az MKK5 PB1 domén (narancs) és az ubikvitin monomer (rózsaszín) szerkezetének egymásra illesztett képe. Jól látható az ábrán, hogy a kötődésben fontos PB1 felület (két fekete nyíl közötti szakasz) hasonló a két szerkezetben, valamint a polimer lánc kialakulásában fontos K63 (piros) nem ütközik ezzel a kölcsönható felszínnel.

A jövőben még szeretném pontosan tisztázni a XIAP-függő ERK5 szabályozás részleteit, és atomi szintű betekintést szeretnék nyerni, hogy a MAP3K-on megjelenő poliubikvitin milyen mechanizmus révén fejti ki a hatását a jelpályán.



## 7. Összefoglaló

A Mitogén Aktivált Protein Kinázok (MAPK) nagy mértékben konzervált enzimei a sejtjes jelátviteli hálózatoknak. Számos fiziológiai folyamatban töltenek be kulcsszerepet, mint például sejtosztódás, differenciáció, stressz válaszok vagy apoptózis és autofágia. A MAPK kaszkádok három szintből álló jelátviteli modulokból épülnek fel, ahol a jel lineárisan halad a legfelső szinttől a legalsóig (MAP Kináz Kináz Kináz, MAP3K → MAP Kináz Kináz, MAP2K → MAPK). Az egyes szinteken található fehérjék egymáshoz közeli rokonsági viszonyban állnak, ebből kifolyólag katalitikus doménjeik szerkezete is hasonlóak. Előbbi tulajdonságuknak köszönhetően felmerül az a kérdés, hogy az egyes jelátviteli útvonalak miképp képesek a megfelelő módon működni.

Doktori munkám során ezen paralóg enzimek kutatásához az irodalomban jól ismert ERK2, illetve kevésbé ismert ERK5 útvonalakat hasonlítottam össze, főképp a MAP2K-MAPK átmenetre fókuszálva. Elsőként feltártam az ERK5-t aktiváló MKK5 enzim azon szerkezeti egységeit, amelyek felelősek az ERK5-höz való kötődésben. Ezen régiók kölcsönhatását a szubsztráttal mind interakciós, mind foszforilációs módszerekkel kvantitatívan is jellemeztem. Az eredmények azt mutatták, hogy mindhárom főbb MKK5 szerkezeti elem részt vesz az interakcióban (PB1-domén, D-motívum, kináz domén aktív hely).

Későbbiekben röntgenkristallográfia segítségével szerkezeti alapon is vizsgáltam az MKK5-ERK5 komplexet, s feltártam az MKK5 PB1 doménje és dokkoló motívuma által létrehozott kölcsönhatás természetét. Az MKK5 PB1-D konstrukció két felszínén, a klasszikus dokkoló- és egy  $\beta$ -redő által biztosított kölcsönhatáson keresztül kötődik az ERK5-höz. A kapott szerkezetek (komplex, ill. apoERK5) és az ERK2 kináz doménjének szerkezetének összehasonlítása jól mutatja a szubsztrát kötés specificitásának szerkezeti hátterét. A két kináz domén dokkoló árok környékének topológiai különbsége, illetve egy az evolúciós elválás után az ERK5-on kialakult extra interakciós elem a szerkezeti alapja a két hasonló kináz által létrehozott eltérő fehérje-fehérje kölcsönhatási mintázatoknak.

A kristályszerkezetből az is kiderült, hogy az ERK5 jelpálya elemei (MEKK2/3, MKK5, ERK5) képesek egy harmadlagos szignalizációs komplexbe szerveződni. Ezt a mechanizmust az MKK5 PB1 doménje biztosítja, amely különböző felszíneken köti az őt

aktiváló MEKK2/3 PB1 doménjét, illetve a szubsztrát ERK5-t. Ennek az „állványozó” funkciónak a segítségével az ERK5 jelpálya rendelkezik egy ubikvitin-függő szabályozással is, ahol a MEKK2/3-on megjelenő nem-degradációs ubikvitin polimer befolyásolja az ERK5 foszforiláltságát. Ez a reguláció képes a MAP3K szinten befolyásolni a közös elemmel rendelkező útvonalak közti funkcionális váltás mechanizmusát, mivel ez a szabályozás csak az ERK5 útvonalon működik, a JNK útvonalat (MEKK2/3 → MKK7 → JNK) nem érinti.

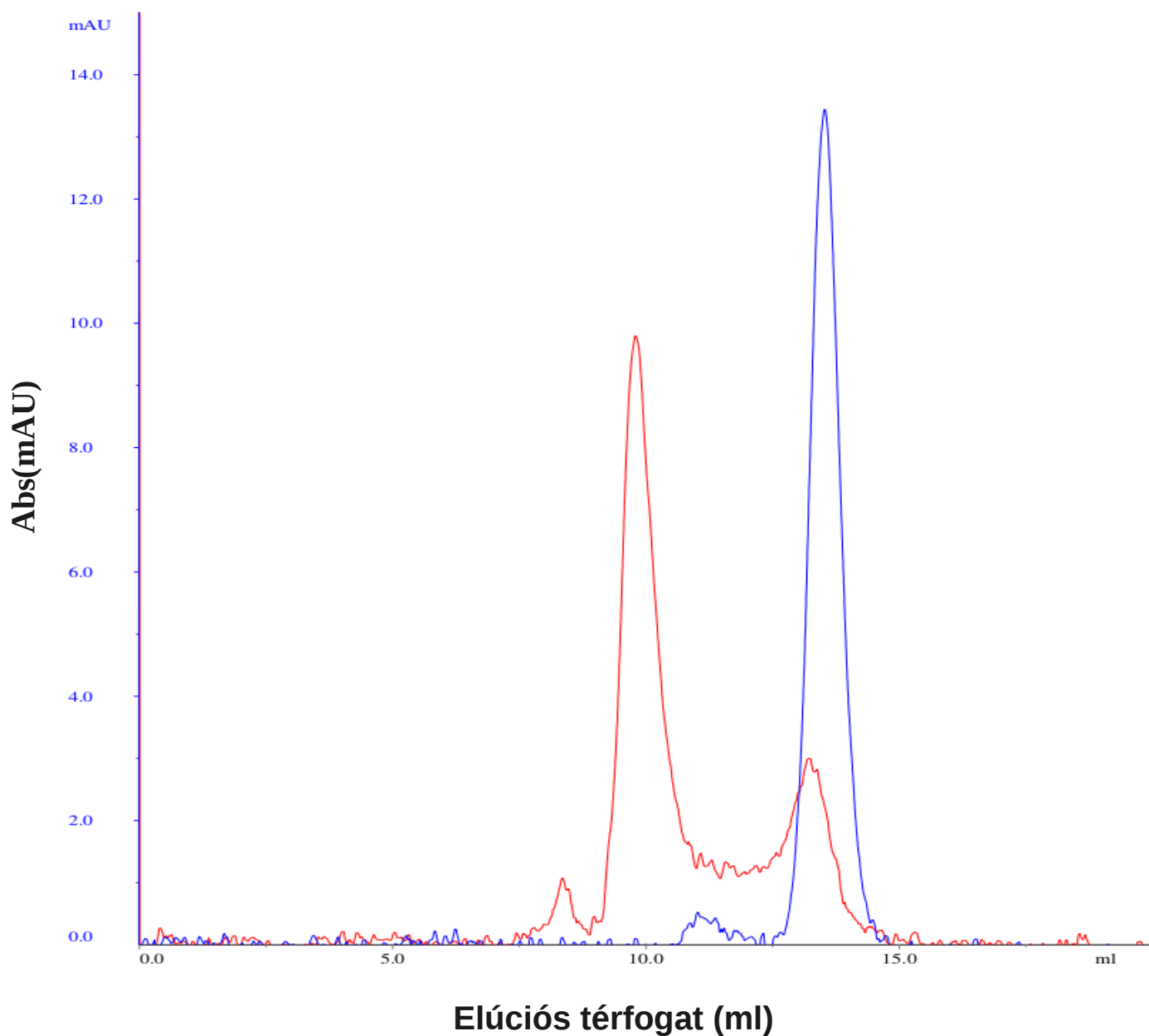
## 8. Abstract

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are well-conserved elements of human signal transduction. They play critical roles in many biological processes, e.g. proliferation, differentiation, stress-induced signaling and apoptosis. MAPKs are activated through phosphorylation by MAPK kinases (MKKs). MKK5 is a specific activator of ERK5, which fulfills non-redundant physiological roles compared to its ERK1/2 paralogs. MKK1/2-ERK1/2 and MKK5-ERK5 pathways are clearly evolutionarily related, and they serve as a paradigm on how functionally distinct pathways can be built using paralogous signaling enzymes.

Pull-down and fluorescence polarization (FP) based assays showed that minimally two MKK5 interacting regions are required to bind ERK5. A Phox and Bem1 (PB1) domain and a linear motif (D-motif) from MKK5 cooperate to mediate high affinity binding to ERK5. MAPK activation depends on a linear binding motif found in all MAPK kinases (MKK). I present the crystal structure of ERK5 in complex with an MKK5 construct comprised of the PB1 domain and the linear binding motif. The structure reveals that ERK5 has distinct protein-protein interaction surfaces compared to ERK2, which is the closest ERK5 paralog. The two MAPKs have characteristically different physiological functions and their distinct protein-protein interaction surface topography enables them to bind different sets of activators and substrates. Structural and biochemical characterization revealed that the MKK5 PB1 domain cooperates with the MAPK binding linear motif to achieve substrate specific binding. In addition this domain also enables co-recruitment of the upstream activating enzyme and the down-stream substrate into one signaling competent complex. The upstream activator kinase for MKK5 is MEKK2/3, which also activates MKK7 that in turn activates c-jun N-terminal kinase (JNK) signaling. ERK5 and JNK signaling is functionally distinct and I demonstrate that ERK5 pathway activity is diminished upon MEKK2/3 ubiquitination by XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein). Interestingly, JNK activation is not inhibited by ubiquitination of this shared upstream activator kinase.

Overall, my results give mechanistic insight into how signaling cascades using common components and/or similar paralogues enzymes can achieve functionally distinct, specific outcomes.

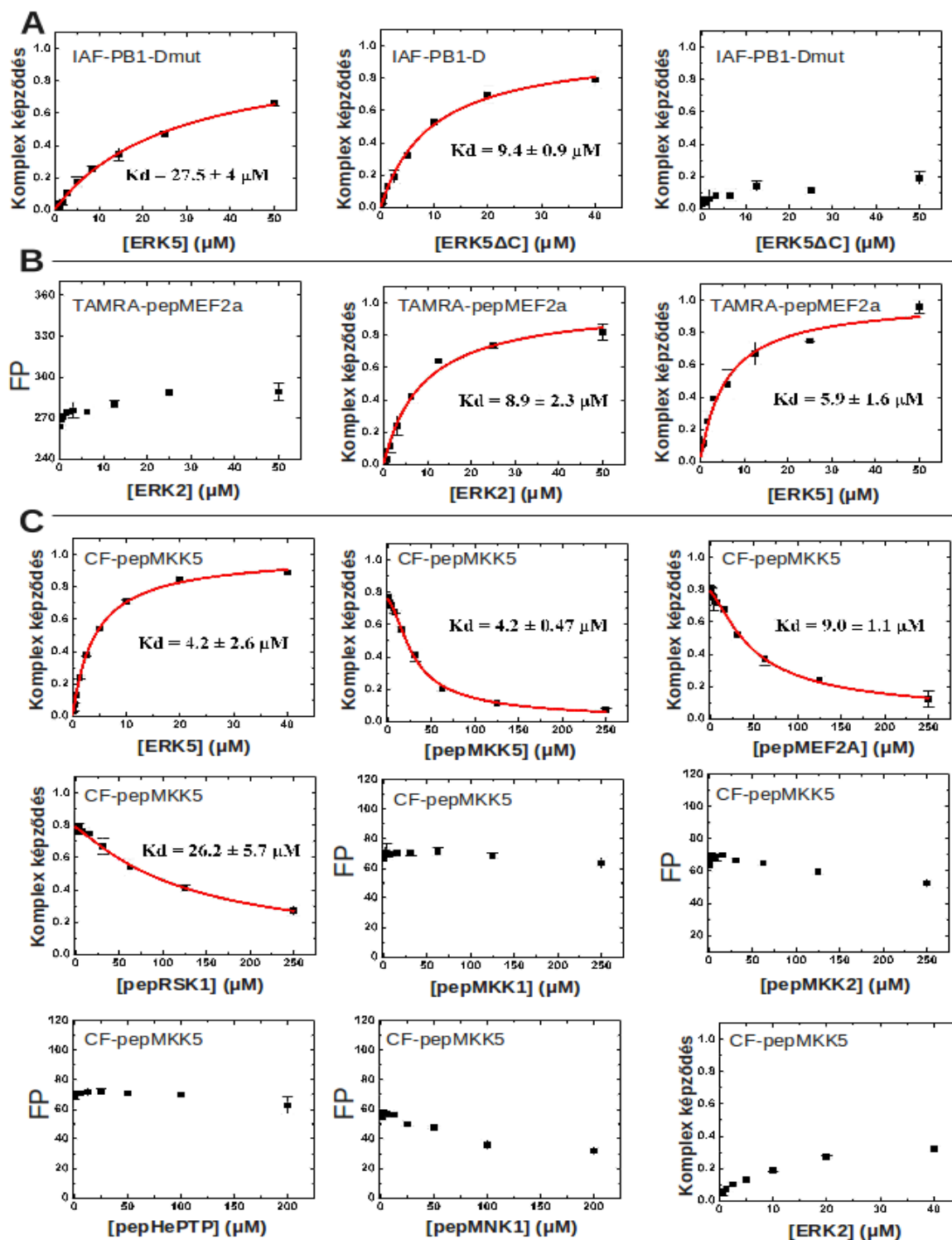
## 9. Mellékletek



**1. Melléklet)** Az MKK5 PB1-D-IAF és ERK5 komplex gélfiltrálás kromatogramja. A feleslegben használt jelölt PB1-D-IAF az ERK5 mellett (piros csúcs) korábbi frakcióban jött le a Superdex 75 gélfiltráló oszlopról, mint ERK5 jelenléte nélkül (kék csúcs). A komplexképződés kialakulását első körben az IAF jelölt PB1-D-vel végeztem, ahol a jelölés specifikus hullámhosszán, 492 nm-en követtem az abszorbancia változását.

ERK5	27_	HTAASVAAKNLALLKARSFDVTFDVGDEYEIIETIGNGAYGVVSSARRRLTGQQVAIKKI	86
ERK2	1_	MAAAAAAGAGPEMVRG---QVFDVGPRYTNLSYIGEGAYGMVCSAYDNVNKVRVAIKKI	56
		100	
ERK5		PNAFDVVTNAKRTLRELKILKHF <sup>•</sup> KHDNIIA <sup>•</sup> IKDILRPTVPYGE <sup>•</sup> F <sup>•</sup> KS <sup>•</sup> VYVVL <sup>•</sup> DL <sup>•</sup> MESDL <sup>•</sup> HQ	146
ERK2		S-PFEHQTYCQRTLREIKILLRFRHENIIGINDIIRAPT-IEQMKDVYIVQDLMETDLYK	114
		<b>Q hurok</b> <b>Specifitási hurok</b> 200	
ERK5		IIHSSQPLTLEHVRYFLYQLLRGLKYM <sup>•</sup> HS <sup>•</sup> AQ <sup>•</sup> VI <sup>•</sup> HRDLKPSNLLVN <sup>•</sup> EN <sup>•</sup> CELKIGDFGMARG	206
ERK2		LLKT-QHLSNDHICYFLYQILRGLKYIHSANVLHRDLKPSNLLLNTTCDLKICDFGLAR-	172
		<b>Aktivációs hurok</b>	
ERK5		LCTSPA <sup>•</sup> EHQYFM <sup>•</sup> TE <sup>•</sup> YVATRWYRAPELMLS <sup>•</sup> LHEY <sup>•</sup> TQAIDLWSVGCIFGEMLA <sup>•</sup> RRQLFPGKN	266
ERK2		VADPDHDHTGFLTEYVATRWYRAPEIMLNSKGYTKSIDIWSVGCILAEMLSNRPIFPGKH	232
		300	
ERK5		YVHQLQLIMMVLGT <sup>•</sup> PSPAVIQAVGA <sup>•</sup> ERV <sup>•</sup> RAYIQ <sup>•</sup> SLPPRQVPVW <sup>•</sup> ETVYPGADRQALSLLGR	326
ERK2		YLDQLNHILGILGSPSQEDLN <sup>•</sup> CIINL <sup>•</sup> KARNYLLSLPHKNKVPWNRLFPNADSKALD <sup>•</sup> LLDK	292
ERK5		MLRFEPSARISAAAALRHPFLAKYHDPDDEPDCAPPFDFAFDRE <sup>•</sup> ALTRERIKEA <sup>•</sup> IVAEIE	386
ERK2		MLTFNPHKRIEVEQALAH <sup>•</sup> PYLEQYYDPSDEPIAEAPFKFDMELDDL <sup>•</sup> PKEKLKELIFEETA	352
		<b>C-terminális extenzió</b> 400	
ERK5		DFHARREGIRQQIRFQPSLQP	407
ERK2		-----RFQPGYRS	360

**2. Melléklet)** Az ERK5 és ERK2 kinázok szekvencia összehasonlítása. A szekvencián belül piros betűkkel kiemelve a kötődési különbségekért felelős szakaszok. Az összehasonlítás BLAST algoritmus segítségével készült.



**3. Melléklet) A) Az MKK5-ERK5 komplex szerkezet ellenőrzésének FP mérés eredményei. B) A jelölt PB1-D-vel és jelölt MEF2A peptiddel elvégzett FP mérés eredményei. C) A különböző dokkoló motívumokból származó peptidekkel elvégzett FP mérés eredményei. A y-tengelyen feltüntetett mértékegység mesterséges polarizációs egység (FP), vagy a komplex képződés aránya. Mérésszám: N=3**

## 10. Hivatkozások

1. Cori GT, Cori CF. THE FORMATION OF HEXOSEPHOSPHATE ESTERS IN FROG MUSCLE. *J Biol Chem.* 1936 Nov 1;116(1):119–28.
2. FISCHER EH, KREBS EG. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem.* 1955;216(1):121–32.
3. Westheimer F. Why nature chose phosphates. *Science* (80- ). 1987;
4. Cohen P. The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol.* 2002 May;4(5):E127–30.
5. Kennelly PJ, Krebs EG. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem.* 1991 Aug 25;266(24):15555–8.
6. Kennelly PJ. Archaeal protein kinases and protein phosphatases: insights from genomics and biochemistry. *Biochem J.* 2003 Mar 1;370(Pt 2):373–89.
7. Mayer BJ GR. Functions of SH2 and SH3 domains. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1998;228 :1–22.
8. Pawson T. Sh2 And Sh3 Domains In Signal Transduction. *Adv Cancer Res.* 1994;64:87–110.
9. Schlessinger J. SH2/SH3 signaling proteins. *Curr Opin Genet Dev.* 1994 Feb;4(1):25–30.
10. Sudol M, Chen HI, Bougeret C, Einbond A, Bork P. Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Lett.* 1995 Aug 1;369(1):67–71.
11. Hmitou I, Druillennec S, Valluet A, Peyssonnaud C, Eychène A. Differential regulation of B-raf isoforms by phosphorylation and autoinhibitory mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2007 Jan;27(1):31–43.
12. Leonard C, Aravind L, Koonin E. Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the “eukaryotic” protein kinase superfamily. *Genome Res.* 1998;
13. Rudolph J, Tolliday N, Schmitt C. Phosphorylation in halobacterial signal transduction. *EMBO J.* 1995;Sep 1(14(17)):4249–57.
14. Spudich J, Stoeckenius W. Light-regulated retinal-dependent reversible phosphorylation of Halobacterium proteins. *J Biol Chem.* 1980;
15. Wang J, Koshland D. Evidence for protein kinase activities in the prokaryote Salmonella typhimurium. *J Biol Chem.* 1978;

16. Hanks S, Quinn A, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* (80- ). 1988 Jul 1;241(4861):42–52.
17. Leonard CJ, Aravind L, Koonin E V. Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: Evolution of the “eukaryotic” protein kinase superfamily. *Genome Res.* 1998;8(10):1038–47.
18. Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem Sci.* 2002 Oct;27(10):514–20.
19. Abi-Rached L, Gilles A, Shiina T, Pontarotti P, Inoko H. Evidence of en bloc duplication in vertebrate genomes. *Nat Genet.* 2002 May;31(1):100–5.
20. Gu X, Wang Y, Gu J. Age distribution of human gene families shows significant roles of both large- and small-scale duplications in vertebrate evolution. *Nat Genet.* 2002 Jul;31(2):205–9.
21. McLysaght A, Hokamp K, Wolfe KH. Extensive genomic duplication during early chordate evolution. *Nat Genet.* 2002 Jul;31(2):200–4.
22. Caffrey DR, O’Neill LA, Shields DC. The evolution of the MAP kinase pathways: coduplication of interacting proteins leads to new signaling cascades. *J Mol Evol.* 1999 Nov;49(5):567–82.
23. Hunter T. A thousand and one protein kinases. *Cell.* 1987 Sep;50(6):823–9.
24. Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 1995 May;9(8):576–96.
25. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 2002 Dec 6;298(5600):1912–34.
26. Hanks S. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol.* 2003;4(5):111.
27. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev. Endocrine Society;* 2001 Apr 1;22(2):153–83.
28. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 1998 Jan;74:49–139.
29. Errede B, Cade RM, Yashar BM, Kamada Y, Levin DE, Irie K, et al. Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev.* 1995 Dec;42(4):477–85.



30. Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, et al. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*. 1992 Jul 30;358(6385):417–21.
31. Crews CM, Erikson RL. Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast *byr1* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Sep 1;89(17):8205–9.
32. Clapéron A, Therrien M. KSR and CNK: two scaffolds regulating RAS-mediated RAF activation. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3143–58.
33. Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J*. 1997 Apr 15;16(8):1901–8.
34. Nekrasova T, Shive C, Gao Y, Kawamura K, Guardia R, Landreth G, et al. ERK1-Deficient Mice Show Normal T Cell Effector Function and Are Highly Susceptible to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*. American Association of Immunologists; 2005 Aug 4;175(4):2374–80.
35. Pagès G, Guérin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, et al. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science*. 1999 Nov 12;286(5443):1374–7.
36. Bode AM, Dong Z. The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog*. 2007 Aug;46(8):591–8.
37. Whitmarsh AJ, Davis RJ. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med*. 1996 Oct;74(10):589–607.
38. Oltmanns U, Issa R, Sukkar MB, John M, Chung KF. Role of c-jun N-terminal kinase in the induced release of GM-CSF, RANTES and IL-8 from human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 2003 Jul;139(6):1228–34.
39. Kyriakis JM, Avruch J. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem*. 1996 Oct 4;271(40):24313–6.
40. Foltz IN, Gerl RE, Wieler JS, Luckach M, Salmon RA, Schrader JW. Human mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MKK7) is a highly conserved c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) activated by environmental stresses and physiological stimuli. *J Biol Chem*. 1998 Apr 10;273(15):9344–51.
41. Haeusgen W, Herdegen T, Waetzig V. The bottleneck of JNK signaling: molecular and functional characteristics of MKK4 and MKK7. *Eur J Cell Biol*. 90(6-7):536–44.
42. Wang X, Destruent A, Tournier C. Physiological roles of MKK4 and MKK7: insights from animal models. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1349–57.

43. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. 1994 Aug 5;265(5173):808–11.
44. Tudor C, Marchese FP, Hitti E, Aubareda A, Rawlinson L, Gaestel M, et al. The p38 MAPK pathway inhibits tristetraprolin-directed decay of interleukin-10 and pro-inflammatory mediator mRNAs in murine macrophages. *FEBS Lett*. 2009 Jun 18;583(12):1933–8.
45. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 1994 Jan 29;372(6508):739–46.
46. Saccani S, Pantano S, Natoli G. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nat Immunol*. 2002 Jan;3(1):69–75.
47. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway Activation and function. *Cell Signal*. 2000 Jan;12(1):1–13.
48. Shi Y, Gaestel M. In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance. *Biol Chem*. 2002 Oct 1;383(10):1519–36.
49. Reményi A, Good MC, Lim WA. Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks. *Curr Opin Struct Biol*. 2006 Dec;16(6):676–85.
50. Garai Á, Zeke A, Gógl G, Törő I, Fördös F, Blankenburg H, et al. Specificity of linear motifs that bind to a common mitogen-activated protein kinase docking groove. *Sci Signal*. 2012 Oct 9;5(245):ra74.
51. Bardwell AJ, Frankson E, Bardwell L. Selectivity of docking sites in MAPK kinases. *J Biol Chem*. 2009 May 8;284(19):13165–73.
52. Brennan DF, Dar AC, Hertz NT, Chao WCH, Burlingame AL, Shokat KM, et al. A Raf-induced allosteric transition of KSR stimulates phosphorylation of MEK. *Nature*. 2011 Apr 21;472(7343):366–9.
53. McKay MM, Freeman AK, Morrison DK. Complexity in KSR function revealed by Raf inhibitor and KSR structure studies. *Small GTPases*. 2011 Jan;2(5):276–81.
54. Nihalani D, Wong HN, Holzman LB. Recruitment of JNK to JIP1 and JNK-dependent JIP1 phosphorylation regulates JNK module dynamics and activation. *J Biol Chem*. 2003 Aug 1;278(31):28694–702.
55. Koushika SP. “JIP”ing along the axon: the complex roles of JIPs in axonal transport. *Bioessays*. 2008 Jan;30(1):10–4.

56. Hayashi M, Lee J-D. Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J Mol Med (Berl)*. 2004 Dec;82(12):800–8.
57. Roberts OL, Holmes K, Müller J, Cross DAE, Cross MJ. ERK5 and the regulation of endothelial cell function. *Biochem Soc Trans*. 2009 Dec;37(Pt 6):1254–9.
58. Roberts OL, Holmes K, Müller J, Cross DAE, Cross MJ. ERK5 is required for VEGF-mediated survival and tubular morphogenesis of primary human microvascular endothelial cells. *J Cell Sci*. 2010 Sep 15;123(Pt 18):3189–200.
59. Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature*. 1998 Oct 15;395(6703):713–6.
60. Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, Kuida K. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 9;99(14):9248–53.
61. Wang X, Merritt AJ, Seyfried J, Guo C, Papadakis ES, Finegan KG, et al. Targeted deletion of mek5 causes early embryonic death and defects in the extracellular signal-regulated kinase 5/myocyte enhancer factor 2 cell survival pathway. *Mol Cell Biol*. 2005 Jan;25(1):336–45.
62. Nakamura K, Johnson GL. PB1 domains of MEKK2 and MEKK3 interact with the MEK5 PB1 domain for activation of the ERK5 pathway. *J Biol Chem*. 2003 Sep 26;278(39):36989–92.
63. Nakamura K, Uhlik MT, Johnson NL, Hahn KM, Johnson GL. PB1 domain-dependent signaling complex is required for extracellular signal-regulated kinase 5 activation. *Mol Cell Biol*. 2006 Mar 15;26(6):2065–79.
64. Nakamura K, Johnson GL. Noncanonical function of MEKK2 and MEK5 PB1 domains for coordinated extracellular signal-regulated kinase 5 and c-Jun N-terminal kinase signaling. *Mol Cell Biol*. 2007 Jun 15;27(12):4566–77.
65. Pothoff MJ, Olson EN. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development*. 2007 Dec;134(23):4131–40.
66. Liu L, Cavanaugh JE, Wang Y, Sakagami H, Mao Z, Xia Z. ERK5 activation of MEF2-mediated gene expression plays a critical role in BDNF-promoted survival of developing but not mature cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8532–7.
67. Kato Y, Kravchenko V V, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J*. 1997 Dec 1;16(23):7054–66.

68. Buschbeck M, Ullrich A. The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J Biol Chem.* 2005 Jan 28;280(4):2659–67.
69. Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1995 May 26;270(21):12665–9.
70. Kondoh K, Terasawa K, Morimoto H, Nishida E. Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2006 Mar;26(5):1679–90.
71. Kasler HG, Victoria J, Duramad O, Winoto A. ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol.* 2000 Nov;20(22):8382–9.
72. Moscat J, Diaz-Meco MT, Albert A, Campuzano S. Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions. *Mol Cell.* 2006 Sep 1;23(5):631–40.
73. Seyfried J, Wang X, Kharebava G, Tournier C. A novel mitogen-activated protein kinase docking site in the N terminus of MEK5alpha organizes the components of the extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2005 Nov 15;25(22):9820–8.
74. Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, et al. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science.* 1991 Jul 26;253(5018):407–14.
75. Taylor SS, Kornev AP. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem Sci.* 2011 Mar;36(2):65–77.
76. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* 1988 Jul 1;241(4861):42–52.
77. Zhou J, Adams JA. Participation of ADP dissociation in the rate-determining step in cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry.* 1997 Dec 16;36(50):15733–8.
78. Gibbs C, Zoller M. Rational scanning mutagenesis of a protein kinase identifies functional regions involved in catalysis and substrate interactions. *J Biol Chem.* 1991 May 15;266(14):8923–31.
79. Kornev AP, Haste NM, Taylor SS, Eyck LF Ten. Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 21;103(47):17783–8.
80. Tanoue T, Nishida E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal.* 2003 May;15(5):455–62.

81. Tanoue T, Maeda R, Adachi M, Nishida E. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J*. 2001 Feb 1;20(3):466–79.
82. Sharrocks AD, Yang SH, Galanis A. Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem Sci*. 2000 Sep;25(9):448–53.
83. Biondi RM, Nebreda AR. Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem J*. 2003 May 15;372(Pt 1):1–13.
84. Mukhopadhyay D, Riezman H. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*. 2007 Jan 12;315(5809):201–5.
85. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*. 2002 Apr;82(2):373–428.
86. Schnell JD, Hicke L. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem*. 2003 Sep 19;278(38):35857–60.
87. Miranda M, Sorkin A. Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol Interv*. 2007 Jun;7(3):157–67.
88. Schulman BA, Harper JW. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 May;10(5):319–31.
89. Van Wijk SJL, Timmers HTM. The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB J*. 2010 Apr;24(4):981–93.
90. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*. 2001 Jan;70:503–33.
91. Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*. 1983 Jul 10;258(13):8206–14.
92. Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*. 2009 Oct;37(Pt 5):937–53.
93. Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, et al. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*. 2003 Aug;21(8):921–6.
94. Kirisako T, Kamei K, Murata S, Kato M, Fukumoto H, Kanie M, et al. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J*. 2006 Oct 18;25(20):4877–87.

95. Metzger MB, Hristova VA, Weissman AM. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci.* 2012 Feb 1;125(Pt 3):531–7.
96. Srinivasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a name? *Mol Cell.* 2008 Apr 25;30(2):123–35.
97. O’Riordan MXD, Bauler LD, Scott FL, Duckett CS. Inhibitor of apoptosis proteins in eukaryotic evolution and development: a model of thematic conservation. *Dev Cell.* 2008 Oct;15(4):497–508.
98. Mueller TD, Feigon J. Solution structures of UBA domains reveal a conserved hydrophobic surface for protein-protein interactions. *J Mol Biol.* 2002 Jun 21;319(5):1243–55.
99. Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010 Aug;10(8):561–74.
100. Oberoi TK, Dogan T, Hocking JC, Scholz R-P, Mooz J, Anderson CL, et al. IAPs regulate the plasticity of cell migration by directly targeting Rac1 for degradation. *EMBO J.* 2012 Jan 4;31(1):14–28.
101. Dogan T, Harms GS, Hekman M, Karreman C, Oberoi TK, Alnemri ES, et al. X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility. *Nat Cell Biol.* 2008 Dec;10(12):1447–55.
102. Takeda A, Oberoi-khanuja TK, Glatz G, Schulenburg K, Scholz R, Carpy A, et al. Ubiquitin-dependent regulation of MEKK 2 / 3-MEK5- ERK5 signaling module by XIAP and cIAP1. *EMBO J.* 2014;33(16):1–18.
103. Goldman A, Roy J, Bodenmiller B, Wanka S, Landry CR, Aebersold R, et al. The calcineurin signaling network evolves via conserved kinase-phosphatase modules that transcend substrate identity. *Mol Cell.* Elsevier Inc.; 2014 Aug 7;55(3):422–35.

A doktori értekezés alapjául szolgáló publikációk:

Glatz G, Gogl G, Alexa A, Remenyi A (2013) Structural mechanism for the specific assembly and activation of the extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) module. J Biol Chem 288: 8596 – 8609

Takeda AN, Oberoi-Khanuja TK, Glatz G, Schulenburg K, Scholz RP, Carpy A, Macek B, Remenyi A, Rajalingam K. (2014) Ubiquitin-dependent regulation of MEKK2/3-MEK5-ERK5 signaling module by XIAP and cIAP1. EMBO J. 33(16):1784-801.

Schulenburg, K., Glatz, G., Remenyi, A., & Rajalingam, K. (2014). Divide and rule: The role of ubiquitination in inactivation of the ERK5-MAPK cascade. Molecular & Cellular Oncology, 1(4), e969170.

## 11. Rövidítésjegyzék

AGC	PKA (protein kináz A), PKG (protein kináz G), PKC (protein kináz C) tartalmazó család
AMPPNP	5'-adenilil-béta, gamma-imidodifoszfát
APS	ammónium-peroxo-diszuéfát
Asp/D	aszparaginsav
ATP	adenozin-trifoszfát
BOG	Oktil-béta-D-glükopiranozid
bp	bázispár
CaCl <sub>2</sub>	kalcium-klorid
CAMK	kalcium/kalmodulin-függő protein kináz (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase)
CF	karboxifluorescein
CGMC	CDK (ciklin dependens kináz), GSK3 (glikogén szintáz kináz), MAPK, CLK (Cdc2-szerű kináz) tartalmazó család
CHAPS	3-[(3- Kolamidopropil)dimetilammonium]-1-propánszulfonát
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CK1	kazein kináz 1
D-motívum	Dokkoló motívum
Da	dalton
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
DTT	ditiotreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDC	N-etil-N'-dimetilaminopropil-karbodiimid
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav-dinátrium-só
ERK	extracelluláris szignál regulált kináz
Phe/F	fenil-alanin
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
Glu/E	glutaminsav
Gly/G	glicin
GST	glutation-S-transzferáz



HEPES	N-(2-hidroxietyl)piperazin-N'-2-etán szulfonsav
HePTP	hemopoetikus protein-tirozin foszfatáz
His/H	hisztidin
HSM	Humán vázizom mioblaszt
IAF	5-jódacetamidfluoreszcein
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktozid
JIP	JNK interakciós protein
JNK	c-Jun N-terminális kináz
KCl	kálium-klorid
Kd	disszociációs állandó
KD	Kináz domén
kDa	kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	kálium-dihidrogén-foszfát
KNO <sub>3</sub>	kálium-nitrát
LB (agarlemez)	Luria Bertani
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MBP	maltóz kötő fehérje
MEF2A	myocyte enhancer factor-2 A
MgCl <sub>2</sub>	magnézium-klorid
MKK/MAP2K/MAPKK	mitogén-aktivált protein kináz kináz
MEKK/MAP3K/MAPKKK	mitogén-aktivált protein kináz kináz kináz
MHC	Miozin Nehézlánc, <i>Myosin Heavy Chain</i>
MNK1	mitogén aktivált protein kináz szignál integráló kináz 1
MyBP	Mielin bázikus fehérje
NA	nem aktiválható
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-nátrium-hidrogén-foszfát
NaCl	nátrium-klorid
NFAT4	aktivált T-sejt nukleáris faktor ( <i>Nuclear Factor of Activated T-Cells</i> )
NHS	N-hidroxiszukcinimid
NLK	Nemo-szerű kináz
p <sup>32</sup>	32-es foszfát izotóp
p38	38 kilodaltonos protein

PB1 domén	Phox/Bem1p domén
PBS	foszfát tartalmú só (phosphate buffered saline)
PCR	polimeráz láncreakció
PEG	polietilén-glikol
pep	peptid
Pro/P	prolin
RNáz	ribonukleáz
RNS	ribonukleinsav
rpm	percenkénti fordulatszám (round per minute)
RSK1	S6 riboszóma fehérje kináz
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> ) poliakrilamid gélelektroforézis
Ser/S	szerin
STE	Sterile 7, Sterile 11, Sterile 2 élesztő kináz homológok
Ste7	Sterile 7
Thr/T	treonin
TAMRA	5(6)-karboxitetrametilrodamin
TBE	trisz-bór-EDTA
TBS-T	trisz tartalmú só-Tween
TCEP	trisz(2-carboxietil)foszfin hidroklorid
TEMED	Tetrametiletiléndiamin
TEV-proteáz	dohány ( <i>Tobacco etch</i> ) vírus proteáz
TK	tirozin kináz
TKL	tirozin-szerű kináz
Val/V	valin
Tyr/Y	tirozin
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

## **12. Köszönetnyilvánítás**

Végtelen hálával tartozom családomnak és barátaimnak, hogy nem csak doktori munkám során, de egész diákéveim alatt támogattak és töretlen bizalmukat élvezhettem. Külön köszönet jár Dr. Reményi Attilának, Dr. Alexa Anitának és kutató csoportunk többi tagjának, hogy segítették a munkámat. Valamint Dr. Nyitray László tanszékvezető úrnak, hogy egy nagyszerű helyet biztosított munkám elvégzéséhez, ahol nem csak szakmai, de közösségi szinten is fantasztikus volt dolgozni.

Köszönöm szépen!